

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PTEN, MDM2,  
P53 E AR EM LESÕES PROLIFERATIVAS DA  
PRÓSTATA CANINA**

**Luis Gabriel Rivera Calderón**  
**Médico Veterinário e Zootecnista**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PTEN, MDM2,  
P53 E AR EM LESÕES PROLIFERATIVAS  
DA PRÓSTATA CANINA**

**Luis Gabriel Rivera Calderón**

Orientadora: Profa. Dra. Renée Laufer Amorim

Co-orientadora: Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal.

Calderón, Luis Gabriel Rivera

C146a Avaliação da expressão proteica de PTEN, MDM2, P53 e AR em  
lesões proliferativas da próstata canina / Luis Gabriel Rivera Calderón.  
-- Jaboticabal, 2014  
viii, 58 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientadora: Renée Laufer Amorim,  
Banca examinadora: Antonio Carlos Alessi, Kellen de Sousa  
Oliveira.  
Bibliografia

1. Cão, 2. Próstata, 3. Carcinogênese, 4. Imuno-histoquímica-  
expressão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 619:636.7

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PTEN, MDM2, P53 E AR  
EM LESÕES PROLIFERATIVAS DA PRÓSTATA CANINA

**AUTOR:** LUIS GABRIEL RIVERA CALDERON

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA  
VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENÉE LAUFER AMORIM

Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de  
Jaboticabal

Profa. Dra. KELLEN DE SOUSA OLIVEIRA

Universidade Federal de Goiás / Goiânia/GO

Data da realização: 30 de julho de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUIS GABRIEL RIVERA CALDERÓN** – nascido no dia 25 de janeiro de 1990, natural da cidade Florencia, estado de Caquetá, Colômbia. Graduado no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade de Amazônia, no ano 2011. Durante a graduação, participou de vários cursos em Reprodução animal e Produção animal. Foi integrante de dois grupos de investigação: em Fauna silvestre e em Produção bovina, com os quais conseguiu publicar dois artigos científicos em revistas nacionais, e participar como ouvinte ou organizador de vários seminários e congressos nacionais e internacionais. No terceiro ano obteve menção honrosa por excelência acadêmica. Desenvolveu seu estágio curricular no Departamento de Patologia Animal, FCAV/UNESP, câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Bechara, colaborando no desenvolvimento do projeto intitulado: “Inhibition of Pathogen Transmission by Vaccination with Bm86 Antigen”. Em março de 2012 foi aprovado para cursar seu Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal), na FCAV/UNESP, câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim e co-orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. No Mestrado participa no grupo de pesquisa: “Biomarcadores preditivos do câncer: estudo comparativo” liderado pela Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, junto com esse grupo tem publicados resumos enfocados na carcinogênese prostática canina, em congressos nacionais e internacionais. Igualmente, relatou em revistas científicas vários casos clínicos atendidos no Departamento de Clínica Veterinária, FCAV/UNESP Jaboticabal e do Serviço de Patologia FMVZ/UNESP Botucatu. Desde o primeiro semestre do presente ano participa no ambulatorio de Citologia Veterinária da FMVZ/UNESP. Em março do presente ano foi aprovado no curso de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal), na FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim e co-orientação da Profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos. O projeto de Doutorado intitulado: “Estudo em Larga Escala da Expressão Gênica nas Lesões prostáticas pré-neoplásicas e neoplásicas do Cão”, contará com a colaboração da Professora Titular Silvia Regina Rogatto (Faculdade de Medicina, UNESP, Botucatu e Pesquisadora do Centro Internacional de Pesquisas, Hospital AC Camargo, São Paulo, SP).

*“Siempre intentaste. Siempre fallaste. No importa. Intenta otra vez. Falla otra vez. Falla de nuevo. Falla mejor”.*

Samuel Beckett

**Aos meus pais, meus irmãos, meu sobrinho Thomas  
e a toda minha família, dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer a Deus e Nossa Mãe Maria, por permitir-me culminar uma etapa valiosa em minha vida. Ele trouxe-me um ser maravilhoso neste mundo, seu nome é Analid Calderón Molina, meu motor, minha força, meu maior exemplo de que existem anjos aqui na terra.

À minha mãe que sempre desejou o melhor para mim, que Deus te abençoe hoje e sempre. À minha família que me deu o maior apoio para estar no Brasil. Fico muito grato com meu Pai William Rivera Cortés e com meus Irmãos Vivi, Milton Fernando, Fabian, Rafa e Andrés, quero que saibam que os amo com todo meu coração. Agradeço a minha avó Luz, meus tios e meus primos, especialmente: Yamil Rivera, Gloria Valbuena, Cora e Ana. Meu sobrinho Thomas, que só gera alegria no meu coração. Para Milton obrigado pelos seus conselhos e o amor que tem por minha mãe. Agradeço também a Martha que cuida do meu Pai.

Para meus amigos em Colômbia: Harlinson, Pablo e Miguel. Para Magda uma linda mulher que me acompanhou num momento difícil da minha vida. Para meus companheiros da faculdade e meus professores principalmente para Gloria Estrada e Luis Ortegón e Silvia Patricia Mozos, os quais me motivaram para continuar no mundo da ciência.

Aqui no Brasil, também conheci pessoas que devo mencionar por todo o apoio durante este processo de estudo: Yury, Ricardo, Helena, Andrés, Wilson, Donicer, Luis Gabriel, Diana, muito obrigado por tudo. Agradeço ao Professor Bechara por me aceitar no estágio curricular e começar a fazer realidade um sonho. Meus companheiros durante o estágio: Romeu, Paulo, Alessandra e Luciana. Agradeço à Professora Rose por toda sua paciência e os conselhos que me deu, quero que saiba que te admiro muito, porque além de ser uma ótima pesquisadora é uma excelente pessoa. Agradeço aos membros do grupo de pesquisa da Professora Rose: Caroline, Pamela, Marcio, Eduardo, Thais e Claudia. Agradeço muito ao grupo de pesquisa da Professora Renée Laufer especialmente a Talita Raposo, Rosana Lino e Carlos Fonseca, por toda sua dedicação e ajuda no meu projeto, vocês são excelentes pessoas e grandes pesquisadores.



Agradeço a Germana Alegro, por sua sincera amizade, por seus conselhos, carinho e porque sempre esteve na disposição de me ajudar. Agradeço imensamente à Professora Renée Laufer porque me deu a oportunidade de crescer como pessoa e como pesquisador e foi a co-autora deste grande sonho. Agradeço a todo o pessoal do Departamento de Patologia em Jaboticabal e o Serviço de Patologia em Botucatu, que de alguma forma me guiaram para fazer as coisas da melhor maneira possível. Agradeço também a meus companheiros das repúblicas onde morei.

Agradeço finalmente aos Professores que fizeram parte das bancas de Qualificação e Defesa, Professora Marcela, Professor Andrigo, Professor Alessi e Professora Kellen. E Agradeço o apoio da CAPES pela bolsa de estudo e à FAPESP pelo auxílio financeiro gerado na presente pesquisa.

## SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO CEUA.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Próstata canina.....	4
2.2 Lesões proliferativas prostáticas no cão.....	5
2.3 Genes envolvidos na via da sinalização das <i>PI3Ks</i> .....	9
2.4 A complexa rede PTEN/MDM2/p53 associada com o receptor andrógeno (AR) no processo de carcinogênese prostática.....	13
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAIS E METODOS.....	20
4.1 Casuística.....	20
4.2 Microarranjo de Tecido (TMA).....	20
4.3 Técnica imuno-histoquímica.....	21
4.4 Análise estatística.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Análise da expressão proteica do PTEN, MDM2, p53 e AR.....	24
6. DISCUSSÃO.....	33
7 CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41

**Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA) da FCAV/UNESP (Protocolo nº 05466/14).**

## **AValiação DA EXPRESSÃO PROTEICA DE PTEN, MDM2, P53 E AR EM LESÕES PROLIFERATIVAS DA PRÓSTATA CANINA**

**RESUMO** – A próstata canina pode desenvolver espontaneamente lesões proliferativas, associadas com a idade, inflamação e os hormônios, tais como: a hiperplasia prostática benigna (HPB), a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e o carcinoma prostático (CaP). Conseqüentemente, o cão pode ser usado para o estudo do processo carcinogênico da próstata no homem. Alterações na expressão gênica, proteica e na função do *PTEN* e *TP53* foram detectadas nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata humana. A super-expressão da oncoproteína MDM2 e a perda de marcação nuclear do receptor andrógeno (AR) foram correlacionados com progressão tumoral e ineficiência ao tratamento anti-andrógeno do CaP no homem. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão proteica de PTEN, MDM2, p53 e AR para determinar seu papel no processo carcinogênico da próstata canina e validar os resultados obtidos pelo grupo de pesquisa com a técnica de hibridação genômica comparativa (CHG) nesses genes. Com isso, foi construído um microarranjo de tecido (TMA), com 74 amostras da glândula prostática canina, divididas em 18 HPB, 22 PIA, 19 CaP e 15 próstatas de tecido normal. A técnica de imuno-histoquímica para os anticorpos PTEN, MDM2, p53, e AR, foi realizada pelo método de peroxidase e DAB. O PTEN, p53 e AR apresentaram perda de marcação nuclear nos carcinomas prostáticos quando comparados com o tecido prostático normal. Na oncoproteína MDM2, o tecido normal obteve marcação nuclear e citoplasmática discreta enquanto no CaP, mais de 85% das amostras apresentaram super-expressão citoplasmática/nuclear. A perda de marcação nuclear do PTEN, p53 e AR, e o ganho da expressão de MDM2 também foi relatado no CaP do homem, sugerindo que existem semelhanças nas alterações moleculares da rede PTEN/MDM2/p53 e AR em ambas as espécies no processo de carcinogênese prostática. Por conseguinte, a espécie cão é um modelo potencial para o estudo molecular das vias de sinalização como PTEN/MDM2/p53 e AR envolvidas no CaP do homem.

**Palavras-chave:** Cão, Próstata, Carcinogênese, Imuno-histoquímica, Expressão.

## EVALUATION OF PROTEIN EXPRESSION OF PTEN, MDM2, P53, AND AR, IN PROLIFERATIVE LESIONS OF CANINE PROSTATE

**ABSTRACT-** The canine prostate may spontaneously develop prostatic proliferative lesions, associated with aging, inflammation and hormones, such as: benign prostatic hyperplasia (BPH), proliferative inflammatory atrophy (PIA) and prostatic carcinoma (PCa). Consequently, the dog can be used for the study of carcinogenesis process in the prostate of men. Changes in *PTEN* and *TP53* gene and protein expression and function were detected in preneoplastic and neoplastic lesion of human prostate. *MDM2* oncoprotein overexpression and loss of nuclear staining of androgen receptor (AR) were correlated with tumor progression and inefficiency antiandrogen treatment of PCa in men. In this context, the aim of this study was to evaluate PTEN, MDM2, p53 and AR protein expression to determine their role in carcinogenic process of the canine prostate. We built a tissue microarray (TMA), with 74 samples of canine prostate, divided into 18 BPH, PIA 22, 19 PCa and 15 prostates of normal tissue. The immunohistochemistry was carried for PTEN, MDM2, p53, and AR antibodies with peroxidase method and DAB. The PTEN, p53 and AR showed loss of nuclear staining in canine prostate carcinoma compared with normal prostate tissue. MDM2 oncoprotein, in normal tissue was discrete cytoplasmic and we observed nuclear staining in CaP, while more than 85% of the samples showed cytoplasmic/nuclear overexpression. The loss of nuclear staining of PTEN, p53 and AR, and the gain of MDM2 expression was also reported in human PCa, suggesting that there are similarities in the molecular alterations of PTEN/MDM2/p53 network and AR in both species in the process prostate carcinogenesis. Therefore, the dog is a potential model for the study of molecular signaling pathways as PTEN/MDM2/p53 and AR involved in human PCa.

**Keywords:** Dog, Prostate, Carcinogenesis, Immunohistochemical, Expression.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AKT</b>	Oncogene homólogo viral de timoma murino
<b>AMACR</b>	$\alpha$ -metilacil-Coenzima-A racemase
<b>AR</b>	Receptor de Andrógeno
<b>BAD</b>	Agonista associada ao BCL2 na morte celular
<b>BCL-2</b>	Linfoma célula B-2
<b>BCL-XL</b>	Membro da família BCL-2
<b>CAP</b>	Carcinoma Prostático
<b>CGH</b>	Hibridização Genômica Comparativa
<b>CK</b>	Citoqueratina
<b>CKIs</b>	Inibidores de quinases dependentes de ciclinas
<b>c-MYC</b>	Oncogene homólogo de v-MYC
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>DHT</b>	Diidrotestosterona
<b>GPCRs</b>	Receptores acoplados à proteína G
<b>GSTP1</b>	Glutathione S-transferase P1
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HPB</b>	Hiperplasia Prostática Benigna
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>Ki67</b>	Antígeno de proliferação celular
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MDM2</b>	Murino duplo minuto 2
<b>mTOR</b>	Alvo da rapamicina em mamíferos
<b>NKX 3.1</b>	Proteína Homeobox NKX 3.1

<b>P53</b>	Proteína p53
<b>PCA3</b>	Antígeno prostático de câncer 3
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PDK1</b>	Fosfoinositido-dependente de quinase 1
<b>PI3Ks</b>	Fosfatidilinositol-3 quinases
<b>PIA</b>	Atrofia Inflamatoria Proliferativa
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
<b>PSA</b>	Antígeno próstatico específico
<b>PSMA</b>	Antígeno de membrana prostático específico
<b>PTEN</b>	Homólogo de fosfatase e tensina
<b>RTKs</b>	Receptores de tirosina quinase
<b>T<sub>4</sub></b>	Testosterona
<b>TGF beta1</b>	Fator de transformação do crescimento
<b>TMA</b>	Microarranjo de Tecido
<b>TP53</b>	Gene TP53
<b>UPIII</b>	Uroplaquina III
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotélio vascular

**LISTA DE TABELAS**

		Página
Tabela 1	Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em próstatas normais e com lesões proliferativas, cortes parafinizados.	21
Tabela 2	Tecido utilizado como controle positivo, localização, distribuição e intensidade da imunomarcação para os anticorpos testados.	22
Tabela 3	Resultados em escore de distribuição na imunomarcação das proteínas PTEN, MDM2, p53 e AR no tecido prostático normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.	25
Tabela 4	Grupos que apresentaram diferença estatística quando foi comparado seu escore por distribuição na imunomarcação com PTEN.	26
Tabela 5	Grupos que apresentaram diferença estatística quando foi comparado seu escore por distribuição das células imunomarcadas com MDM2.	27
Tabela 6	Grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando foi comparado seu escore por distribuição na marcação de células positivas para p53.	27
Tabela 7	Grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando foi comparado seu escore por distribuição na marcação de AR.	28



**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1 Esquema da via de sinalização das fosfatidilinositol-3 quinases (PI3Ks).	12
Figura 2 Reação imuno-histoquímica de PTEN na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.	29
Figura 3 Reação imuno-histoquímica de MDM2 na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.	30
Figura 4 Marcação imuno-histoquímica de p53 na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão	31
Figura 5 Imuno-histoquímica de AR na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.	32

## 1 INTRODUÇÃO

O homem, o cão e outras espécies animais podem desenvolver espontaneamente lesões proliferativas prostáticas associadas com a idade e com os hormônios andrógenos, incluindo: hiperplasia prostática benigna (HPB) e carcinoma prostático (CaP) (TESKE et al., 2002; LEROY; NORTHUTUP, 2009). Outra lesão considerada pré-neoplásica na próstata do homem, de origem possivelmente inflamatória, denominada atrofia inflamatória proliferativa (PIA) também foi identificada na próstata canina (TOLEDO et al., 2010).

A HPB e o CaP são doenças que se manifestam em homens e cães adultos, em idade reprodutiva, como resultado de um desequilíbrio entre a proliferação e a apoptose das células prostáticas (LEROY; NORTHUTUP, 2009; NUNZIO et al., 2011).

No homem, aproximadamente 90% dos indivíduos com 80 anos de idade padecem HPB; um de três pacientes poderia requerer tratamento para mitigar os sintomas causados pela doença (TIMMS; HOFKAMP, 2011). A idade, os hormônios e a interação epitélio-mesênquima, são fatores que contribuem na patogênese da HPB, mas, os mecanismos precisos da sua origem ainda são desconhecidos (SMITH, 2008; TIMMS; HOFKAMP, 2011). Ademais, o desenvolvimento da HPB, atualmente, não é considerado um fator de risco para a ocorrência do CaP (NUNZIO et al., 2011).

Outra lesão prostática de importância no homem, é o CaP. Dentro das neoplasias, é a segunda causa de óbito no Brasil, estima-se 68.800 novos casos para o ano 2014 (INCA, 2013). É também a segunda neoplasia no homem com maior incidência no mundo (1.111.686 indivíduos), e a quinta causa de óbito (307.471 indivíduos), nos últimos cinco anos (WHO, 2012). Fatores de risco para seu desenvolvimento incluem: a idade, o histórico familiar, e a raça; assim como fatores ambientais e possivelmente a dieta (RUBIN; DE MARZO, 2004).

Na espécie canina, o CaP é raro, ocorre em 5-7% dos indivíduos com doença prostática (SMITH, 2008). A doença é diagnosticada, principalmente, em estados avançados sem resposta à terapia com privação de andrógenos (MACLACHLAN;

KENNEDY, 2004; SMITH, 2008).

Os carcinomas prostáticos no homem e no cão são localmente invasivos, possuem predileção por metástases no tecido ósseo e podem mostrar variação no seu curso clínico (LEROY; NORTHUTUP, 2009; HEIDENREICH et al., 2011; COLLEDGE et al., 2013). Esses aspectos clínico-patológicos sugerem que o cão é um modelo potencial para o estudo da progressão e crescimento do CaP no homem (CORNELL et al., 2000; ROSOL et al., 2004; TOMAS et al., 2007; WINKLER, 2007; ARGYLE, 2009; KELLER et al., 2013). Em ambas as espécies são desconhecidas as etiologias tanto da HPB, quanto da PIA e do CaP. Não obstante, comprovou-se que algumas vias de sinalização gênicas envolvidas na sobrevivência, proliferação e diferenciação celular podem estar alteradas no processo de carcinogênese prostática (VISAKORPI et al., 1995a; TAMURA et al., 1999; NELSON; DE MARZO; DEWEESE, 2001; SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008, YU et al., 2014a).

Genes supressores tumorais responsáveis pelo controle desses processos celulares, como o homólogo de fosfatase e tensina (*PTEN*) e *TP53*, que atuam de forma independente e dependente da via das fosfatidilinositol-3 quinases (PI3Ks), apresentam um papel importante no surgimento do CaP no homem (TAMURA et al., 1999; SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008; UZOH et al., 2009; WOZNEY; ANTONARAKIS, 2014). Outrossim, existe evidencia de que a oncoproteína murino duplo minuto 2 (MDM2) envolvida na complexa rede PTEN/MDM2/p53, está implicada na inibição da apoptose de células neoplásicas, ao degradar a proteína p53 no citoplasma (MAYO et al., 2002; TOVAR et al., 2011). A super-expressão de MDM2 é correlacionada com agressividade tumoral, maior risco de metástases, menor tempo de sobrevida e aumento na refração andrógena (JUVEN-GERSHON; OREN, 1999; LEITE, 2001).

A rede PTEN/MDM2/p53 está intimamente associada ao receptor andrógênio (AR) (CARVER, 2011; WANG et al., 2011). Esse receptor nuclear é ativado pela testosterona para ligar-se com fatores de transição que regulam a expressão gênica de diversas proteínas (VISAKORPI et al., 1995b; CHATTERJEE, 2003; YUAN et al., 2013). Em condições normais, o AR é importante para a manutenção da diferenciação

prostática (NICHOLSON; RICKE, 2011), comportando-se como um antagonista de PTEN e de p53 no processo de apoptose celular (VISAKORPI et al., 1995b; MAYO; DONNER, 2002).

Assim, o conhecimento destes marcadores pode ser útil em estudos de oncologia comparada, uma vez que o tumor de próstata no cão apresenta características epidemiológicas, clínicas, comportamento biológico e molecular semelhante como homem, servindo como um modelo animal potencial para o entendimento da gênese do CaP (TOMAS et al., 2007; WINKLER, 2007; ARGYLE, 2009; KELLER et al., 2013).

Neste estudo, objetivou-se avaliar a expressão proteica de PTEN, MDM2, p53 e AR, no processo de gênese tumoral prostático, além de validar os resultados obtidos pela técnica de CGHarray em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, para permitir uma melhor compreensão da via das PI3Ks e dos genes dependentes (*MDM2*) e independentes (*PTEN*, *AR*, *TP53*) da mesma e, com isso, estabelecer uma nova perspectiva para o prognóstico do CaP no cão.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Próstata canina

A próstata constitui a única glândula sexual acessória importante do cão (SMITH, 2008). Em outros mamíferos há, adicionalmente, glândulas vesiculares e bulbouretrais (BRUDAS et al., 2007). Limita-se pelo reto dorsalmente e pela sínfise púbica na região ventral nos animais adultos, enquanto nos jovens até dois anos de idade se localiza na região pélvica em torno da uretra proximal (ROOT-KUSTITZ; KLAUSNER, 2000; JOHNSTON et al., 2000; EVANS; LAHUNTA, 2013).

Os lobos glandulares se encontram envoltos por uma cápsula fibrosa que possui fibras musculares lisas (*musculo urethralis*) (KÖNING; MAIERL; LIEBICH, 2005). Cada lobo é dividido em lóbulos por trabéculas (KÖNING; MAIERL; LIEBICH, 2005). Glândulas túbulo-acinares são organizadas dentro dos lóbulos e separadas por estroma de tecido conjuntivo e músculo liso. As secreções provenientes dessas glândulas são drenadas através de pequenos condutos que desembocam na uretra (LEROY; NORTHRUP, 2008; SMITH, 2008).

No parênquima da próstata as células são de dois tipos, epitelial e estromal. As células estromais compreendem os fibroblastos e células musculares lisas (BARSANTI; FINCO, 1992; EROSCHENKO, 2008), enquanto, o epitélio prostático de tipo colunar biestratificado é constituído por células secretoras luminiais e células basais. As células basais estão relacionadas com o desenvolvimento e organização dos ductos e ácinos (LEAV et al., 2001; LEROY; NORTHRUP, 2008).

As glândulas túbulo-acinares secretam o fluido prostático, composto por citrato, lactato e colesterol, que auxiliam no transporte, nutrição e metabolismo dos espermatozóides, além de globulinas e enzimas hidrolíticas envolvidas na liquefação do sêmen, após ser depositado no trato genital feminino (JOHNSTON et al., 2000; PURSWELL et al., 2000).

## 2.2 Lesões proliferativas prostáticas no cão

A espécie animal que apresenta com mais frequência lesões proliferativas prostáticas é o cão, destacando-se: a hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e o carcinoma prostático (CaP). A HPB é uma doença espontânea que se manifesta nos cães não castrados, com prevalência de 95% nos indivíduos acima de nove anos de idade (SMITH, 2008; NASCIMENTO; SANTOS; EDWARDS, 2011). A idade, os hormônios e a interação epitélio-mesênquima são fatores que contribuem na patogênese da HPB, mas os mecanismos precisos da sua origem ainda são desconhecidos (FOSTER; LADDS, 2007; TIMMS; HOFKAMP, 2011). O desenvolvimento da HPB não é fator de risco para a ocorrência do CaP, embora, a inflamação crônica pode estar implicada na progressão tanto da HPB quanto do CaP (NUNZIO et al., 2011).

Na HPB canina, o crescimento glandular prostático é excêntrico, causando constipação possivelmente pela compressão do reto. Microscopicamente, esta lesão é classificada dependendo de quais células estão comprometidas, como: hiperplasia do epitélio acinar e hiperplasia fibromuscular (FOSTER; LADDS, 2007).

Em relação aos fatores hormonais, sabe-se que os andrógenos têm um papel importante na regulação do crescimento da glândula prostática, através do receptor de andrógeno (AR) (GALLARDO et al., 2009). A testosterona ( $T_4$ ) e seu metabólito diidrotestosterona (DHT) ligam-se aos receptores androgênicos nucleares que sinalizam a transcrição de fatores de crescimento mitogênicos para as células epiteliais e estromais (LEAV et al., 2001; DE MOURA et al., 2006). A DHT pode ser dez vezes mais potente que a  $T_4$  na estimulação do crescimento celular prostático, um aumento na sua produção está relacionado diretamente com o surgimento da HPB (JOHNSTON et al., 2000; DE MOURA et al., 2006; MEMON, 2006).

Andrógenos e estrógenos são utilizados para induzir a HPB no cão (TRACHTENBERG; HICKS; WALSH, 1980; ROYUELA et al., 2001; GALLARDO et al., 2007, 2009). Gallardo et al., (2009) demonstraram que a HPB canina induzida pelo

tratamento com esses hormônios, apresenta um aumento da expressão do AR nas células epiteliais, no entanto, a diminuição da expressão do AR foi identificada após a suspensão do tratamento. Existe evidência de que os andrógenos, pela via AR, não estimulam a proliferação celular nos animais com glândula prostática normal (WU et al., 2007). Segundo Nicholson e Ricke (2011) o AR é importante na manutenção da diferenciação prostática e pode atuar, igualmente, na supressão da proliferação epitelial.

A PIA é outra lesão importante na proliferação celular, considerada precursora do CaP e associada à inflamação (TOMAS et al., 2007; DE MARZO et al., 2007; BILLIS, 2010; PERLETTI et al., 2010; CELMA et al., 2013). É considerada como uma resposta de proliferação celular causada por infecção, dano celular por estresse oxidativo, hipoxia ou autoimunidade (WOENCKHAUS; FENIC, 2008). O conceito de PIA foi proposto por De Marzo et al. (1999) para a próstata humana, designa o foco de proliferação glandular epitelial com aparência morfológica de uma atrofia simples ou hiperplasia pós-atrótica, ocorrendo em associação com inflamação crônica. Histologicamente a PIA no homem localiza-se com frequência na região periférica, adjacente a focos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e/ou CaP (TOMAS et al., 2007; WANG; BERGH; DAMBER, 2009; BASTARÓS et al., 2014). No estudo de caracterização histomorfológica da PIA no cão realizado por Toledo et al. (2010), determinou-se que o epitélio displásico formado por ácinos atróficos sempre era acompanhado por infiltrado inflamatório intersticial, predominantemente linfocitário, um padrão histológico similar à PIA humana.

O incremento da expressão da proteína antiapoptótica BCL-2, do marcador de proliferação celular Ki67 (MIB-1) e do gene *c-MYC*, além da diminuição de expressão dos genes supressores tumorais: *NKX 3.1*, *CDK1NB* que codifica o p57 e do *PTEN*, sustentam a hipótese de que a PIA no homem é uma lesão pré-neoplásica (RUSKA; SAUVAGEOT; EPSTEIN, 1998; SUGAR, 2006; DE MARZO et al., 2007; WANG; BERGH; DAMBER, 2009).

No cão também foi relatado um aumento da expressão de MYC e diminuição na expressão do *NKX 3.1* na PIA e no CaP, quando comparado à próstata normal

(FONSECA-ALVES et al., 2013). A inflamação crônica é um fator importante para o desenvolvimento de diversos cânceres em humanos e modelos animais (COUSSENS; WERB, 2002). Segundo Maclennan et al. (2006), no homem, existe uma forte relação entre a inflamação crônica e lesões pré-malignas e malignas nas alterações do epitélio prostático. A expressão aumentada das proteínas COX-2 (ZHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2010) e Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) (DE MARZO et al., 2007; CROCE et al., 2011) na PIA do homem e do cão, pode ser considerada como uma resposta celular para o estresse oxidativo associado a radicais livres na inflamação crônica (WOENCKHAUS; FENIC, 2008; CROCE et al., 2011). Nas lesões proliferativas prostáticas caninas, a GSTP1 e o óxido nítrico encontraram-se super-expressos ao ser comparadas com o epitélio prostático normal, sugerindo que esses mediadores da inflamação protegem o tecido prostático normal contra danos efetuados por estresse oxidativo (CROCE et al., 2011). O *GSTP1* pode sofrer silenciamento na transição de PIA para PIN e no CaP, incrementando a suscetibilidade das células epiteliais prostáticas contra danos genômicos efetuados por oxidantes inflamatórios e agentes carcinogênicos derivados dos alimentos (WAGENLEHNER et al., 2007; WANG; BERGH; DAMBER, 2009; CELMA et al., 2014).

Ainda existem muitos questionamentos sobre o papel da PIA no surgimento do CaP no homem e no cão, sendo necessárias mais avaliações genéticas e epigenéticas em futuras investigações para se obter um melhor entendimento desta lesão.

O CaP é uma neoplasia rara que ocorre em 5-7% dos cães com doença prostática, espontaneamente, com prevalência em indivíduos entre oito e dez anos de idade (SMITH, 2008). A castração e a idade avançada são consideradas os principais fatores de risco para seu surgimento (BRYAN et al., 2007; LEROY; NORTHUTUP, 2009). Há alta prevalência da doença em cães machos castrados, que pode se desenvolver em um tempo variável após a castração, mas na mesma idade que em cães não castrados, o que sugere que a castração não é um fator inibidor do CaP (TESKE et al., 2002; SOREMNO, 2003). A maioria dos CaPs no cão são diagnosticados após manifestar sinais clínicos similares à HPB, em função do aumento de tamanho do órgão (FOSTER, 2009). Os sinais clínicos incluem: anorexia, perda de peso, hematúria,



estragúria, tenesmo e debilidade nos membros pélvicos (SMITH, 2008; JACOBS et al., 2013). Geralmente os pacientes que manifestam esses sinais clínicos já apresentam metástase nos linfonodos pélvicos, sub-lombares, ossos e diferentes órgãos, incluindo o cérebro (MACLACHLAN; KENNEDY, 2004; FOSTER, 2009).

O diagnóstico do CaP no cão é confirmado pelo exame histopatológico, no qual, o padrão característico é intra-alveolar, acompanhado frequentemente com focos de HPB, dilatação glandular cística, e áreas com inflamação aguda ou crônica (LEROY; NORTHUTUP, 2009).

A etiologia e classificação do CaP do cão ainda não foram completamente elucidadas. No estudo de Cornell et al. (2000), as neoplasias prostáticas foram classificadas como: adenocarcinomas, carcinomas uroteliais, carcinomas de células escamosas ou carcinomas mistos, que incluem dois ou mais tipos de diferenciação: glandular, urotelial, escamosa ou sarcomatóide. Das 76 neoplasias prostáticas avaliadas nesse estudo, 36% foram consideradas adenocarcinomas, contudo, mais da metade desses tumores exibiram heterogeneidade intratumoral. A denominação de adenocarcinoma de próstata no cão ainda é discutida por muitos autores, uma vez que uma parte significativa das neoplasias pode expressar marcadores de origem urotelial (SOREMNO et al., 2003; LAI et al., 2008; FOSTER, 2009). No homem é possível distinguir-se o carcinoma de origem prostático do carcinoma urotelial (ou carcinoma das células transicionais), mediante a imunomarcagem do antígeno prostático específico (PSA) (MAKAROV et al., 2009).

Outros biomarcadores como a  $\alpha$ -metilacil-Coenzima-A racemase (AMACR), GSTP1, Lactato desidrogenase (LDH), Ki-67, MicroRNAs, p63, PTEN, antígeno prostático de câncer 3 (PCA3), TGF beta1, entre outros, podem ser utilizadas como biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e predição do CaP no homem. (NELSON et al., 2001; PARSONS et al., 2001; NARUSE et al., 2007; WOODSON et al., 2008; SZCZYRBA et al., 2011; CHOUCAIR et al., 2012; YAP et al., 2012; CRAWFORD et al., 2012; FISHER et al., 2013; FELGUEIRAS; SILVA; FARDILHA, 2014)

A caracterização histomorfológica e imuno-histoquímica do CaP no cão foi relatada por vários autores nos últimos anos (SOREMNO, 2003; GRIECO et al., 2003;

LEROY et al., 2004; LAI et al., 2008; FONSECA-ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013). Lai et al. (2008) analisaram 20 neoplasias com vários imunomarcadores implementados anteriormente nos CaP no homem. Nesse estudo a marcação para PSA foi de 8/20, para o antígeno de membrana prostático específico (PSMA) de 11/20, enquanto, a uroplaquina III (UPIII) e a citoqueratina 7 (CK7) (marcadores para carcinomas das células transicionais no homem) expressaram marcação em 17/20 e 12/20 dos carcinomas, respectivamente. Outras citoqueratinas como a CK5, CK14 e CK18, também foram altamente expressas no tumor prostático. Os autores propõem que a diferença de marcação dessas proteínas no CaP no cão tornam essa lesão proliferativa mais agressiva e menos diferenciada ao ser comparada com o câncer de próstata no homem.

Uma diferença importante entre o CaP no homem e no cão é o papel que desenvolvem os andrógenos como fator de crescimento da neoplasia. A maioria dos CaPs no homem, no estágio inicial, são altamente dependente dos andrógenos, e portanto, a privação desses hormônios pode ser utilizada para sua terapia. Em contraste, os CaPs nos cães não respondem ao tratamento com andrógenos, mesmo no estágio inicial da doença. Por este motivo, o tratamento da neoplasia no cão é feito de forma paliativa, com inibidores de ciclooxigenases, quimioterapia e radiação (SORENMO et al., 2004; SMITH, 2008).

### **2.3 Genes envolvidos na via da sinalização das *PI3Ks***

As fosfatidilinositol-3 quinases (PI3Ks) fazem parte de uma família de enzimas constituídas por um grande grupo de proteínas quinases de serina/treonina, incluindo: as fosfatidilinositol quinases, proteínas quinases dependentes de DNA (DNA-PK), a ataxia telangiectasia mutada (ATM) e a ataxia telangiectasia e Rad3 relacionadas (ATR) (KATSO, 2001). As PI3Ks estão envolvidas na regulação de processos celulares, principalmente, na sobrevivência, proliferação, diferenciação, quimiotaxia e homeostase

da glicose (CUI; CAI; ZHOU, 2014). São classificadas em três classes de acordo com suas características estruturais e sua especificidade de substrato. A classe I é a principal responsável pela transmissão de sinais de crescimento e sobrevivência dos receptores de tirosina quinase (RTKs), dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e dos oncogenes, como a proteína RAS (VARA et al., 2004; LIU et al., 2009).

As PI3Ks classe I são sub-divididas na classe IA e IB. A classe IA é composta por heterodímeros que consistem em uma subunidade catalítica (p110) e uma unidade regulatória (p85) (AKINLEYE et al., 2013; CUI; CAI; ZHOU, 2014). Ao ser ativada a subunidade catalítica p110, as PI3Ks podem fosforilar o substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) e convertê-lo num segundo mensageiro chamado fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) (KATSO, 2001; CHALHOUB; BAKER, 2009). A PIP3 proporciona locais de acoplamentos para proteínas de sinalização que tem domínios de homologia plecstrina (PH), como: a fosfoinositido-dependente de quinase 1 (PDK1) e o AKT também conhecido como proteína quinase B (PKB) (VARA et al., 2004; CHONG et al., 2013). O PDK1 fosforila e ativa a Akt provocando uma ampla gama de eventos na cascata de sinalização.

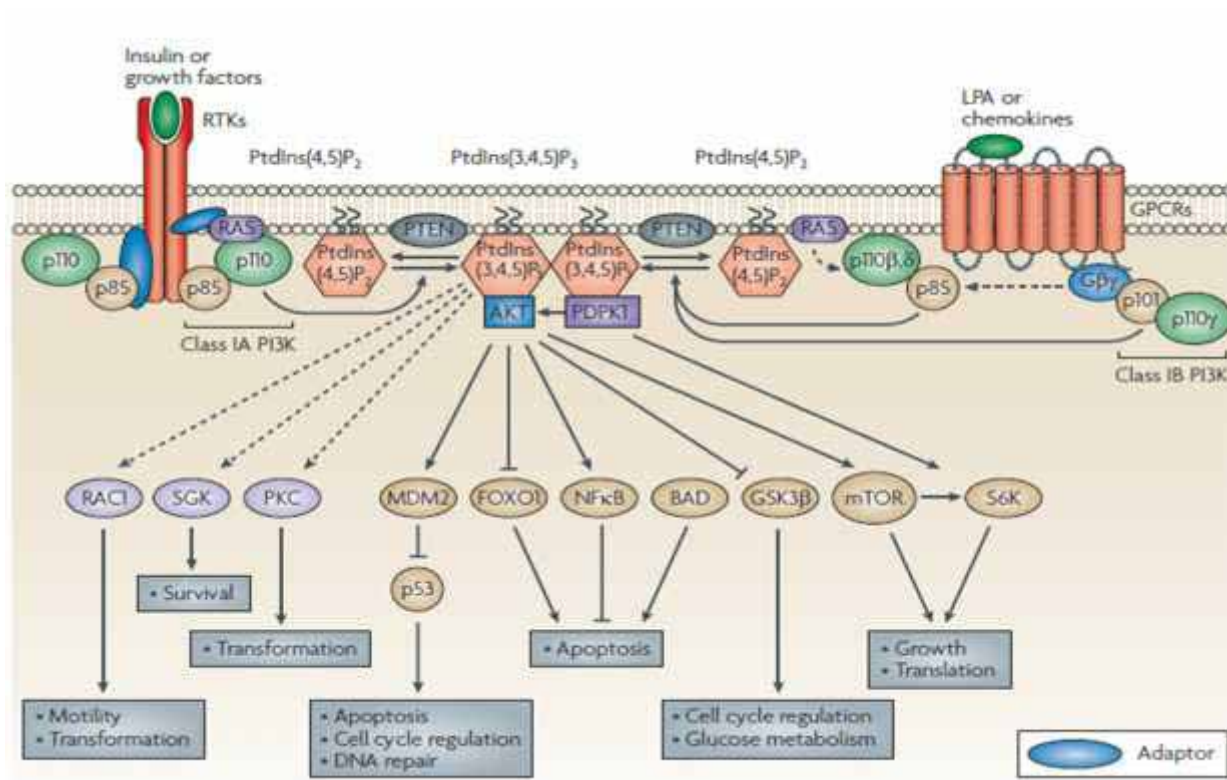
Por sua parte, a classe IB das PI3Ks, é ativada diretamente pelos receptores GPCRs, mediante a interação com a subunidade  $G\beta\gamma$  nas proteínas G triméricas. As subunidades p110 $\beta$  e p110 $\delta$ , também podem ser ativadas por estes receptores (KATSO, 2001; LIU et al., 2009). A fosforização da AKT permite a ativação e inibição de muitas proteínas implicadas na regulação do crescimento, sobrevivência e proliferação celular, além de ter efeitos adicionais sobre a angiogênese tumoral, ao ser mediador do fator indutor de hipóxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e do fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) (VIVANCO; SAWYERS, 2002; GRAUPERA; POTENTE, 2013). A regulação do crescimento celular na via PI3K/AKT é realizada, principalmente, pela associação com a proteína mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), também conhecida como (FRAP1) (OWONIKOKO; KHURI, 2013). Depois de ser fosforilada, mTOR contribui no controle do início da transcrição de RNAm, na formação de ribossomos e, conseqüentemente, na síntese de proteínas em função da disponibilidade de nutrientes (WATANABE; WEI; HUANG, 2011). O aumento da expressão do mTOR foi determinado em diferentes tipos

de cânceres em humanos e animais, e por tanto, a inibição da sua função é considerada um alvo importante para o estudo e elaboração de fármacos antineoplásicos (MERIC-BERNSTAM; GONZALEZ-ANGULO, 2009).

O mecanismo pelo qual o AKT protege as células da morte provavelmente é multifatorial, posto que, esta proteína fosforila vários componentes diretamente envolvidos no processo de sobrevivência (VIVANCO; SAWYERS, 2002). Por exemplo, o BAD, um membro pró-apoptótico da família das proteínas BCL-2, pode promover a morte mediante a formação de um heterodímero não funcional, com o fator de sobrevivência BCL-XL. A fosforilação da BAD pelo AKT evita essa interação, resultando num ganho da função antiapoptótica do BCL-XL (DATTA et al., 1997).

O processo de fosforilação da caspase 9 também é gerado pelo AKT e o membro da família de fatores de transição forkhead (FKHR) (também chamado FOXO1) (MANNING; CANTLEY, 2007), evitando a ativação de proteínas pró-apoptóticas como: BIM e FAS ligante (YUAN et al., 2011). Por fim, o AKT influencia na sobrevivência celular com efeitos indiretos em dois principais reguladores desse mecanismo, o fator nuclear kB (NF-kB) e a proteína p53 (MENG et al., 2002).

A AKT está envolvida nos processos de regulação do ciclo celular ao fosforilar as CKIs (inibidores de quinases dependentes de ciclinas) p21 e p27, favorecendo dessa forma em sua translocação ao citoplasma e posterior degradação. Ao ser abolido o efeito antiproliferativo das CKIs sobre os complexos das ciclina-quinases, a taxa de proliferação celular é aumentada (VIVANCO; SAWYERS, 2002). De forma direta ou indireta, AKT também fosforila e inibe a glicogênio sintetase quinase (GSK3 $\beta$ ), a fosfodiesterase-3B, a proteína fosfatase 2A e possivelmente a RAF1, elaborando uma complexa rede intracelular (SHARMA; CHUANG; SUN, 2002). Na Figura 1, é resumida a via da sinalização das PI3Ks e os diferentes mecanismos de regulação do crescimento, sobrevivência e proliferação celular.



**Figura 1** Esquema da via de sinalização das fosfatidilinositol-3 quinases (PI3Ks). A ativação das classes IA e IB é efetuada por meio da estimulação das RTKs e GPCRs. Na classe IA, depois da conversão por subunidades catalíticas p110 de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) para PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>) proporcionar locais de acoplamentos nas proteínas de sinalização que tem domínios de homologia plestrina, incluindo a PDK1 e o AKT. De forma independente ao AKT, as PI3Ks também estão implicadas na regulação da atividade de outros alvos celulares, como a soro-e-quinase induzida por glicocorticóides (SGK) e as proteínas G pequenas RAC1 e a PKC. A atividade desses alvos leva à sobrevivência, à reorganização do citoesqueleto e a transformação celular. PTEN (Homólogo de fosfatase e tensina) antagonista das PI3Ks por desfosforilação da PIP<sub>3</sub>; BAD, BCL-2 agonistas associados com morte celular; FOXO1, (também conhecido como fator de transição forkhead (FKHR); GSK3β, glicogênio sintetase quinase; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; NFκB, factor nuclear-κB; PKC, proteína quinase; S6K, proteína ribossomal quinase; LPA, ácido lisofosfático.

Fonte: Liu et al., (2009).

## 2.4 A complexa rede PTEN/MDM2/p53 associada com o receptor andrógênio (AR) no processo de carcinogênese prostática.

Os mecanismos de sobrevivência, proliferação e crescimento celular, mencionados anteriormente na via PI3K/AKT, são regulados pela enzima PI-3,4,5-P3 fosfatase ou homólogo de fosfatase e tensina (PTEN). O *PTEN* é conhecido por ser um importante gene envolvido na supressão tumoral, atuando de forma dependente ou independente da via PI3K/AKT (SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008; CHALHOUB; BAKER, 2009). É expresso nas sinalizações de dano celular, bloqueando a sobrevivência da célula mediante a ativação de p53 (MAYO; DONNER, 2002; GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS, 2006).

No homem, o *PTEN* está localizado no braço longo (q) do cromossomo 10, na posição 23,3 (10q23.31), um locus que é altamente susceptível em sofrer deleção de um alelo ou mutação em diferentes carcinomas primários, incluindo: carcinoma renal, glioblastomas, carcinoma endometriode, de mama, de pulmão, de cólon, melanoma e CaP (LI et al., 1997; TAMURA et al., 1999; CHOW; BAKER, 2006; UZOH et al., 2009; CUI et al., 2014). Nos CaPs do homem, são conhecidos três mecanismos de inativação do *PTEN*: deleção cromossômica, mutação somática e alteração epigenética. A inativação bialélica é comumente identificada quando existe mutação de um alelo e deleção do outro (UZOH et al., 2009). A perda ou alteração de um alelo no gene *PTEN* é identificada em 70-80% dos casos de CaP, enquanto, a inativação homozigota se determina com menos frequência (WANG; PARSONS; ITTMANN, 1998; SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008). Wu, McRoberts e Theodorescu (2007) comprovaram que a perda gênica do *PTEN* pode cumprir um papel importante no tropismo das células prostáticas neoplásicas pelo tecido ósseo, na metástase. Atualmente, o rato é o único modelo animal utilizado para descrever as alterações genéticas do *PTEN* no CaP. Nesta espécie foi demonstrado que existe haploinsuficiência do *PTEN* (fenômeno no qual existe apenas uma cópia funcional do gene). No trabalho de Trotman et al., 2003, os níveis celulares da proteína PTEN, foram inversamente correlacionados com a

ocorrência de invasão do CaP. No cão, a mutação do gene *PTEN* foi identificada no câncer de mama, osteossarcoma, hemangiossarcoma e melanoma (KOENIG et al., 2002; LEVINE; FOREST; SMITH, 2002; DICKERSON et al., 2005; QIU et al., 2008).

PTEN regula indiretamente a via das PI3Ks/AKT quando produz a desfosforilação de PIP3 convertendo-lo em PIP2 (TAMURA et al., 1999; AKINLEYE et al., 2013). As PI3Ks e PTEN são enzimas antagonistas na função exercida na PIP3 e, conseqüentemente, possuem efeitos opostos no processo de proliferação e sobrevivência celular (CHALHOUB; BAKER, 2009). Por exemplo, quando PTEN bloqueia a via PI3K/AKT, inibe a função da oncoproteína MDM2, envolvida no processo de sobrevivência celular e no surgimento de várias neoplasias (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006). A perda do PTEN permite ao AKT fosforilar a serina 166 e serina 186 no domínio de MDM2, obrigando a translocação da oncoproteína MDM2 do citoplasma para o núcleo (MAYO; DONNER, 2002; GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS, 2006). Já no núcleo, MDM2 funciona como uma ubiquitina ligase E3, que se liga com a proteína supressora tumoral p53, para formar um complexo, o qual é degradado pelo proteossoma no citoplasma (KLEIN, 2004; TOVAR et al., 2011). O MDM2 inibe a atividade transcricional da p53 e causa alterações no ciclo celular, na reparação do DNA, senescência, angiogênese e apoptose (PANT; LOZANO, 2014). Qualquer perturbação nesses processos permite a acumulação de mutações numa linhagem celular, que pode ser transmitida para futuras gerações, aumentando o risco do desenvolvimento de neoplasias.

A amplificação ou super-expressão de MDM2 podem ser correlacionadas com: lesões proliferativas de alto-grau, agressividade tumoral, maior risco de metástases, menor tempo de sobrevida e aumento na refração hormonal ou resistência para os antineoplásicos (CHÈNE, 2003; YU et al., 2014b). O aumento de expressão de MDM2 é identificada principalmente em sarcomas de tecidos moles, osteossarcomas, leucemias, carcinoma de mama e CaP (JUVEN-GERSHON; OREN, 1999; MAYO; DONNER, 2002; CHÈNE, 2003; YU et al., 2014b). Leite et al. (2001), determinaram que a super-expressão de MDM2 no CaP homem esta frequentemente associada com o incremento de proliferação celular e o aumento de volume do órgão. A importância

dessa oncoproteína como controle da atividade de p53 foi demonstrada em ratos, nos quais efetuou-se o silenciamento de MDM2 (JONES et al., 1995). Os embriões de rato com silenciamento de MDM2 morriam no início da gestação, não obstante, quando era induzida a deleção do *TP53*, não foi promovida a morte destes indivíduos.

Em condições normais, níveis baixos de p53 são degradados no citoplasma da célula por MDM2. PTEN é considerado como um protetor de p53, porque regula a função de MDM2 ao restringi-lo no citoplasma, onde é produzida sua degradação, isto permite também, a amplificação do *TP53*, para promover sua resposta apoptótica celular (STAMBOLIC et al., 2001; MANFREDI et al., 2010)

*TP53* também é considerado um supressor tumoral em mamíferos. Ratos com ausência de *TP53* demonstram maior frequência de desenvolvimento de tumores, quando comparados com ratos normais, a restauração na expressão gênica de *TP53* induz a apoptose e senescência nos tumores (DONEHOWER et al., 1992; WANG et al., 2011). Ratos nos quais foi realizada a deleção do *PTEN* e *TP53*, também obtiveram maior ocorrência de invasão no CaP, quando comparados aos ratos controle (CHEN et al., 2005).

Na via das PI3Ks/AKT, os supressores tumorais PTEN e TP53 não atuam individualmente, os dois são necessários para a regulação de oncoproteínas como a MDM2 e de processos de inibição/estimulação do crescimento, o que permite a formação de uma complexa rede PTEN-MDM2-p53, essencial para a homeostase celular (MAYO; DONER, 2002; DE ASSIS; ISOLDI, 2014).

A função de supressão tumoral do PTEN não é exercida exclusivamente no citoplasma, alguns estudos sugerem que PTEN ingressa no núcleo por vários mecanismos, incluindo: difusão passiva, importação mediada por RAN ou MVP, e monoubiquinação (LIU et al., 2005; GIL et al., 2006; CHALHOUB; BAKER, 2009; BASSI et al., 2013). PTEN nuclear pode ser independente da via PI3Ks/AKT e cumprir outras funções importantes, como: a regulação da integridade cromossomal, a progressão do ciclo celular, a indução de apoptose e a resposta do dano celular através da regulação de RAD51 (CHUNG et al., 2006; GIL et al., 2006; CHALHOUB; BAKER, 2009; KREIS et al., 2014). Ademais, Li et al. (2006), demonstraram que PTEN nuclear pode controlar a



proliferação celular mediante a acetilação de histonas e do p53, essa acetilação é importante para a regulação de fatores de transição, proteínas efectoras, chaperonas e proteínas do citoesqueleto.

A atividade de supressão tumoral de p53 pode ser prejudicada por mutações. Mutações no gene *TP53* ocorrem em mais de 50% de todas as neoplasias detectadas nos humanos (LEROY; ANDERSON; SOUSSI, 2014). No CaP, a mutação de *TP53* é rara, apresentando-se, unicamente nos estágios avançados da doença. O *TP53* mutado também foi relacionado com metástase e crescimento independente de andrógenos nessa neoplasia (KANEKO et al., 2005).

A perda da função de p53 pode inibir a expressão de p21, permitindo a ativação de ciclinas que atuam na progressão do ciclo celular, neste caso, a senescência e a apoptose que são esperadas em condições normais, não serão produzidas depois de efetuar-se um dano celular. Não obstante, vários autores descrevem que o *TP53* mutado pode ter um ganho de funções, não relacionadas com o *TP53* normal, em alguns casos, ocasionando funções de tipo oncogênicas (VAN OIJEN; SLOOTWENG, 2000; OREN; ROTTER, 2010).

A complexa rede PTEN/MDM2/p53 descrita anteriormente está relacionada intimamente com a via do AR, no processo de carcinogênese prostática do homem. Depois de ser fosforilado por andrógenos (testosterona e/ou DHT), o AR altera sua conformação estrutural para permitir sua translocação nuclear, onde regula a expressão de várias proteínas (YUAN et al., 2013). AR nuclear é antagonista de apoptose e contribui no processo de proliferação celular (VISAKORPI et al., 1995a; YUAN et al. 2013).

Tal como acontece no homem, nas fases avançadas da doença, o CaP do cão não responde ao tratamento com antiandrógenos quando é detectado tanto em animais castrados quanto em animais intactos (ROSOL et al., 2004; LAI et al., 2009). Por esta razão, se acreditava, originariamente, que a resistência do tratamento com andrógenos no CaP era devido à perda de expressão do AR, a qual se exacerbava conforme evoluía a neoplasia (QUARMBY et al., 1990), embora novas evidências indicam que o aumento da expressão de AR ocorre com o desenvolvimento de tumores avançados

(LINJA et al., 2001; GUSEVA et al., 2012). No cão, a marcação imuno-histoquímica de AR foi demonstrada uniformemente no núcleo de todas as células epiteliais e a maioria de células estromais durante o desenvolvimento prostático, assim como, nos ácinos e ductos da próstata de animais em idade reprodutiva (GALLARDO et al., 2007; PELLETIER, 2008; NICHOLSON, 2011).

O AR tem a capacidade de ligar-se no domínio fosfatase de PTEN, isto reduz sua translocação nuclear e, portanto, sua transativação (LIN et al., 2004). PTEN também pode promover a degradação do receptor andrógeno e ser um antagonista no processo de proliferação celular (WANG et al., 2011). A perda ou mutação de *PTEN* pode ter um impacto direto na ativação independente de andrógenos por AR. Por exemplo, a inativação de PTEN e ativação da via PI3K/AKT no CaP, proporciona um ambiente favorável para a ativação das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-XL. A super-expressão de BCL-2 foi implicada na conversão de neoplasias prostáticas andrógeno-dependentes em neoplasias prostáticas andrógeno-refratárias no homem (GROSSMANN; HUANG; TINDALL, 2001).

O AR também pode ser regulado por MDM2 em múltiplos níveis. Primeiro, quando é ativada a via PI3K/AKT, é produzida a fosforilação de MDM2 e AR por AKT, quando MDM2 é recrutado na rede AKT-MDM2-AR, funciona como uma ubiquitina ligase E3, promovendo a ubiquitinação e degradação proteossomal de AR (LIN et al., 2002). O segundo nível de regulação ocorre no elemento responsivo aos andrógenos (ARE) dentro dos promotores dos genes alvo de AR. Nas células neoplásicas da próstata expostas a andrógenos, AR se associa com MDM2 e à histona desacetilase 1 (HDAC1) (GAUGHAN et al., 2006). A atividade de HDAC1 é requerida para potencializar a ubiquitinação de AR (LEVAV-COHEN; HAUPT; HAUPT, 2005).

Estudos indicam que a amplificação do gene *AR* (comprovada pela técnica de hibridização por fluorescência do DNA cromossomal) ou mutação (comprovada por sequenciamento de DNA) estão relacionadas com o crescimento acelerado de células neoplásicas malignas e com CaPs humanos em fase avançada, resistentes à terapia anti-hormonal (GELMANN, 2002; CHATTERJEE, 2003; SHAFI; YEN; WEIGEL, 2014). A inibição da expressão de *TP53* por mutação também é observada nos CaPs

hormônio-refratários (CONCATO et al., 2009; GUSEVA et al., 2012), e em alguns casos pode modificar a ligação nuclear do AR, e a capacidade de proliferação das células epiteliais neoplásicas (GUSEVA et al., 2012). Por fim, estudos em cultivos com células neoplásicas da próstata humana (LNCaP) comprovaram que a inibição de *TP53* nuclear aumenta a expressão do AR (ALIMRAH et al., 2007; GUSEVA et al., 2012).

### 3 OBJETIVOS

A partir de estudos prévios do grupo, com a técnica de CGHarray em lesões prostáticas caninas, observou-se alterações no número de cópias (CNVs) dos genes *PTEN*, *MDM2*, *TP53* e *AR*. Baseados nesses achados, o presente estudo teve o objetivo de:

- Avaliar a expressão proteica do PTEN, MDM2, p53 e AR em glândulas prostáticas caninas normais, com hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória prostática (PIA) e carcinoma prostático (CaP).
- Comparar os resultados da expressão imuno-histoquímica dessas proteínas entre as lesões prostáticas do cão.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Casuística

Foram selecionadas 74 próstatas caninas dos arquivos de Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, UNESP, Botucatu e do Departamento de Medicina Veterinária da UFG, Goiânia. As amostras obtidas de blocos de parafina foram cortadas por um micrótomo automático (Leica 2155) com uma espessura de 3µm. Posteriormente se realizou a montagem das lâminas com a técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas com HE foram examinadas por três patologistas, ao mesmo tempo, num microscópio multicabeças. O diagnóstico das lesões observadas em cada lâmina foi realizado de acordo com o estabelecido na literatura para HPB (NASCIMIENTO; SANTOS; EDWARDS, 2011), PIA (TOLEDO et al., 2010), e CaP (LEROY E NORTHUTUP, 2009).

### 4.2 Microarranjo de Tecido (TMA)

Para cada lâmina, a área mais representativa de lesão foi circunscrita e organizada numa lâmina de microarranjo de tecido ou *tissue microarray* (TMA). Essa técnica foi elaborada usando o equipamento *Tissue Microarrayer* (Beencher Instruments, Silver Spring, USA). A lâmina de TMA foi composta por 19 CaP, 22 PIA, 18 HPB e 15 próstatas normais. Cada core na lâmina de TMA correspondia a um animal.

### 4.3 Técnica de imuno-histoquímica

Para realizar a análise da expressão proteica de PTEN, MDM2, p53 e AR foi utilizada uma lâmina de TMA para cada anticorpo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diluições, clones e procedência de anticorpos utilizados em próstatas normais e com lesões proliferativas, cortes parafinizados.

Anticorpos	Espécie/Procedência	Clones	Diluições
PTEN (P)	Coelho/Bioss	Bs-0686R	1:500
MDM2 (P)	Coelho/Abcam	ab38618	1:50
p53(M)	Camundongo/Novocastra	DO-7	1:50
AR (M)	Camundongo/Abcam	ab77557	1:100

\*M=monoclonal e P=policlonal.

Quatro lâminas de TMA foram desparafinizadas em xilol, desidratadas em álcool e lavadas em água deionizada. Para o anticorpo PTEN não foi necessária realizar a recuperação antigênica, enquanto a recuperação antigênica do MDM2, p53 e AR foi feita com citrato pH 6,0, em panela de pressão (Pascal, DAKO). O bloqueio da peroxidase endógena se efetuou com solução de 8% de peróxido de hidrogênio em álcool metílico durante 20 minutos. Após esta etapa, procedeu-se com o bloqueio de proteínas inespecíficas com solução de leite em pó 3% (Molico<sup>®</sup>) durante uma hora em temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida com os anticorpos primários diluídos (Tabela 1) durante 18 horas a 4°C. Como anticorpo secundário foi utilizado o kit Advance (Dako) e 3'-diaminobenzidine tetrahydrocloroeto (DAB, Dako) como cromógeno durante 3 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris e, posteriormente, desidratados e montados com resina, para ser observados no microscópio óptico. Como controle negativo o anticorpo primário foi substituído pela imunoglobulina da espécie que o anticorpo foi produzido, sob as mesmas condições de

reação. Os tecidos utilizados para o controle positivo dos quatro anticorpos estão descritos na Tabela 2.

As lâminas montadas foram observadas em microscópio de luz acoplado a câmera digital e através do programa de análise de imagens QWin 3.0 (Leica). Foram determinados dois tipos de marcação (citoplasmática e nuclear). A intensidade de marcação e o escore por distribuição da marcação foi realizada seguindo a metodologia de Fonseca-Alves et al., (2013). A intensidade de marcação foi considerada como (0- ausente 1 - fraca, 2 - moderada e 3- forte). Enquanto a avaliação do percentual de células marcadas em cada *core* foi por escore de zero a quatro, sendo 1 (menor que 25% das células positivas), 2 (26 a 50% de células positivas), 3 (51 a 75% de células positivas), e 4 (> 75% de células positivas), observadas em objetivo de 40x, para cada *core*.

**Tabela 2.** Tecido utilizado como controle positivo, localização, distribuição e intensidade da imunomarcação para os anticorpos testados.

<b>Anticorpo</b>	<b>Controle positivo</b>	<b>Localização da Marcação</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Intensidade</b>
<b>PTEN</b>	Próstata normal, cão	Citoplasmática/ nuclear	4	2
<b>p53</b>	Próstata normal, cão	Nuclear	4	1
<b>AR</b>	Próstata normal, cão	Nuclear	4	3
<b>MDM2</b>	Próstata normal, cão	Citoplasmática/ nuclear	3	1

#### **4.4 Análise estatística**

Para realizar a análise estatística da expressão proteica de PTEN, MDM2, p53 e AR foi utilizado teste Quiquadrado, os resultados foram considerados estatisticamente significativos com  $p < 0,05$ . A análise estatística foi elaborada com o programa Graph Pad Prism5 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA).



## **5 Resultados**

### **5.1 Análise da expressão proteica do PTEN, MDM2, p53 e AR**

Na seguinte tabela estão os resultados em escore da imunomarcção dos marcadores PTEN, MDM2, p53 e AR no tecido prostático normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.

**Tabela 3.** Resultados em escore de distribuição na imunomarcção das proteínas PTEN, MDM2, p53 e AR no tecido prostático normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão.

Proteína	Grupo	N	N (%)				p
			≤25%	26-50%	51-75%	≥76%*	
		74	1	2	3	4	
PTEN	Normal	15	0	0	5(33.3)	10(66.6)	<0.0001
	HPB	18	0	4(22.2)	7(38.8)	7(38.8)	
	PIA	22	1(4.5)	9(40.9)	6(27.2)	6(27.2)	
	CaP	19	10(52.6)	9(47.4)	0	0	
MDM2	Normal	15	5(33.3)	8(53.3)	1(6.6)	1(6.6)	0.003
	HPB	18	5(27.7)	5(27.7)	5(27.7)	3(16.6)	
	PIA	22	3(13.6)	7(31.8)	6(27.2)	6(27.2)	
	CaP	19	0	2(10.5)	5(26.3)	12(63.1)	
p53	Normal	15	0	2(13.3)	10(66.6)	3(20)	<0.0001
	HPB	18	0	10(55.5)	4(22.2)	4(22.2)	
	PIA	22	0	6(27.2)	6(27.2)	10(45.4)	
	CaP	19	19(100)	0	0	0	
AR	Normal	15	0	0	0	15(100)	<0.0001
	HPB	18	0	0	0	18(100)	
	PIA	22	0	3(13.6)	5(22.7)	14(63.3)	
	CaP	12	9(81.8)	1(9)	2(18.1)	0	

\*A avaliação do percentual de células marcadas em cada *core* do TMA foi realizado por escore de zero a quatro.

A localização de imunomarcação do supressor tumoral PTEN foi citoplasmática e nuclear. No tecido prostático normal observou-se marcação citoplasmática difusa com intensidade fraca, enquanto a marcação nuclear foi de intensidade moderada. Quando comparados os tecidos normais com os CaPs, PTEN apresentou perda de marcação nuclear e aumento da intensidade citoplasmática nos CaPs ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Devido à alta distribuição de células com marcação nuclear na próstata normal (100% das amostras apresentaram mais de 50% de células positivas - escores 3 e 4), a mesma foi utilizada como controle positivo das reações imuno-histoquímicas. Assim, a diminuição de marcação nuclear observada nos CaPs, só foi considerada real quando houve tecido normal adjacente com intensa imunomarcação.

As amostras com HPB obtiveram marcação citoplasmática de intensidade fraca e marcação nuclear de intensidade moderada. Entre esta lesão e o CaP também foi observada diferenç  estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 4).

Na PIA a intensidade de marcação citoplasmática e nuclear do PTEN foi moderada. A PIA foi a lesão que mais apresentou heterogeneidade na distribuição de marcação celular com PTEN. As células epiteliais normais obtiveram diferenç  significativa ao ser comparadas com PIA ( $p = 0,0175$ ) (Tabela 4). Esta diferenç  também foi identificada quando comparou-se PIA com CaP ( $p = 0,0002$ ) (Tabela 4). Na Tabela 4 são mencionados os grupos que apresentaram diferenç  estatística significativa quando foi comparado seu escore da imunomarcação da proteína PTEN.

**Tabela 4.** Grupos que apresentaram diferenç  estatística quando foi comparado seu escore por distribuição na imunomarcação nuclear com PTEN.

Comparação entre grupos			P
Próstata normal	vs	CaP	<0.0001
HPB	vs	CaP	<0.0001
Próstata normal	vs	PIA	0.0175
PIA	vs	CaP	0.0002

MDM2 demonstrou aumento de expressão nos CaPs quando comparados com as próstatas normais ( $p=0.0001$ ) (Tabela 5). O tecido normal apresentou marcação nuclear e citoplasmática discreta, em contrapartida, mais de 85% dos CaP obtiveram aumento na expressão citoplasmática/nuclear. Na HPB foi observada moderada intensidade de marcação citoplasmática e forte marcação nuclear, e ao ser confrontada com o CaP do cão, esta demonstrou baixa expressão proteica ( $p=0.0061$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Grupos que apresentaram diferença estatística quando foi comparado seu escore por distribuição das células imunomarcadas com MDM2

Comparação entre grupos			p
Próstata normal	vs	CaP	0.0001
HPB	vs	CaP	0.0061

Foi observada uma diminuição na expressão nuclear de p53 nos CaPs ao comparar-se com tecido normal prostático ( $p<0.0001$ ) (Tabela 6). Mais de 85% das próstatas normais apresentaram escore 3 ou 4, enquanto, 100% dos CaPs apresentaram escore 1 (<25% de células positivas). Nestes tumores observamos moderada marcação citoplasmática. Na HPB a expressão foi alta quando comparada com o CaP ( $p<0,0001$ ) (Tabela 6). Na PIA, mais de 75% das células apresentaram imunomarcagem de p53, entre este grupo e o CaP observou-se diferença estatística no escore por distribuição da porcentagem de células positivas ( $p<0,0001$ ) (Tabela 5).

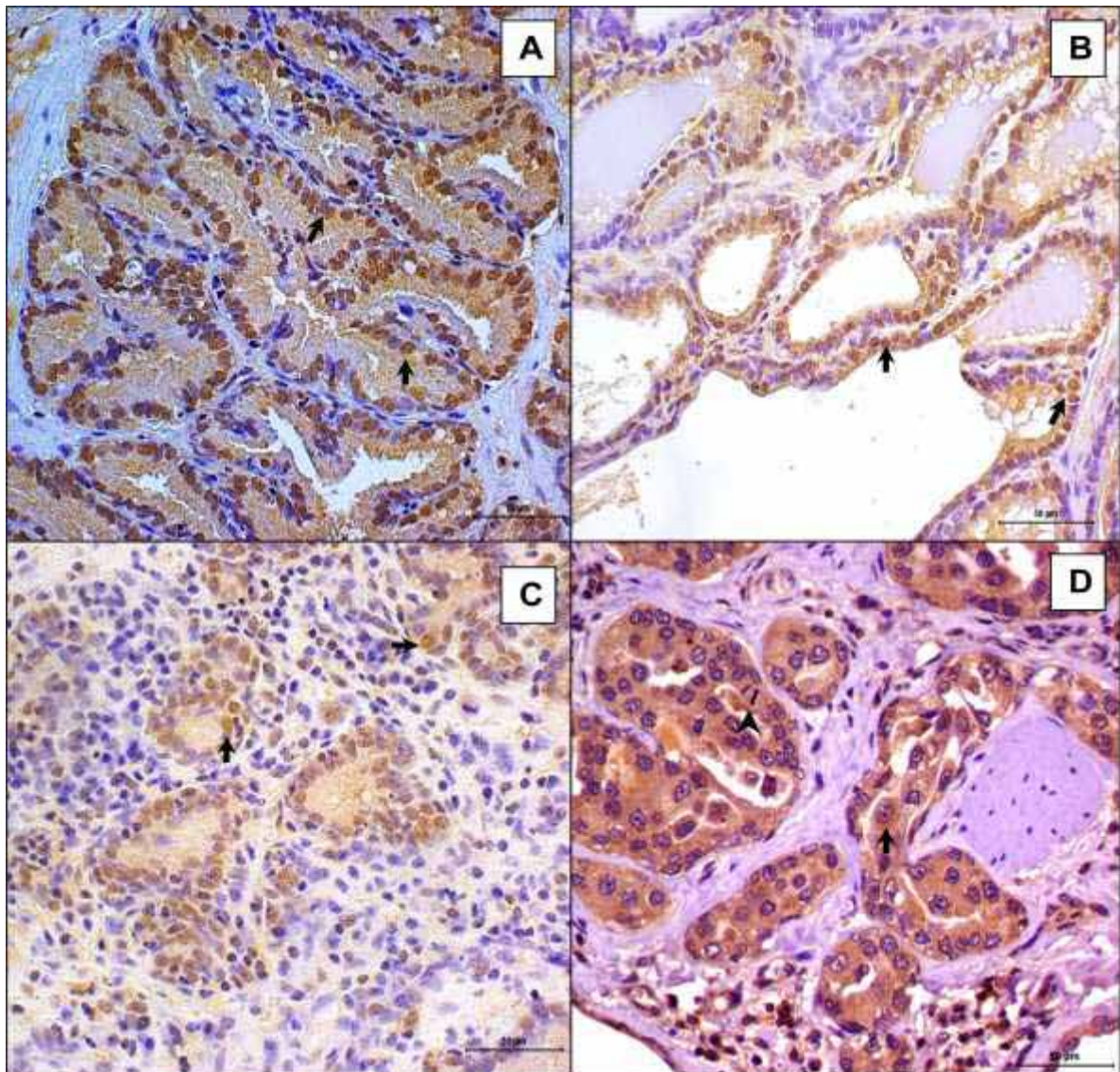
**Tabela 6.** Grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando foi comparado seu escore por distribuição na marcação de células positivas para p53.

Comparação entre grupos			p
Próstata normal	Vs	CaP	<0.0001
HPB	Vs	CaP	<0.0001
PIA	Vs	CaP	<0.0001

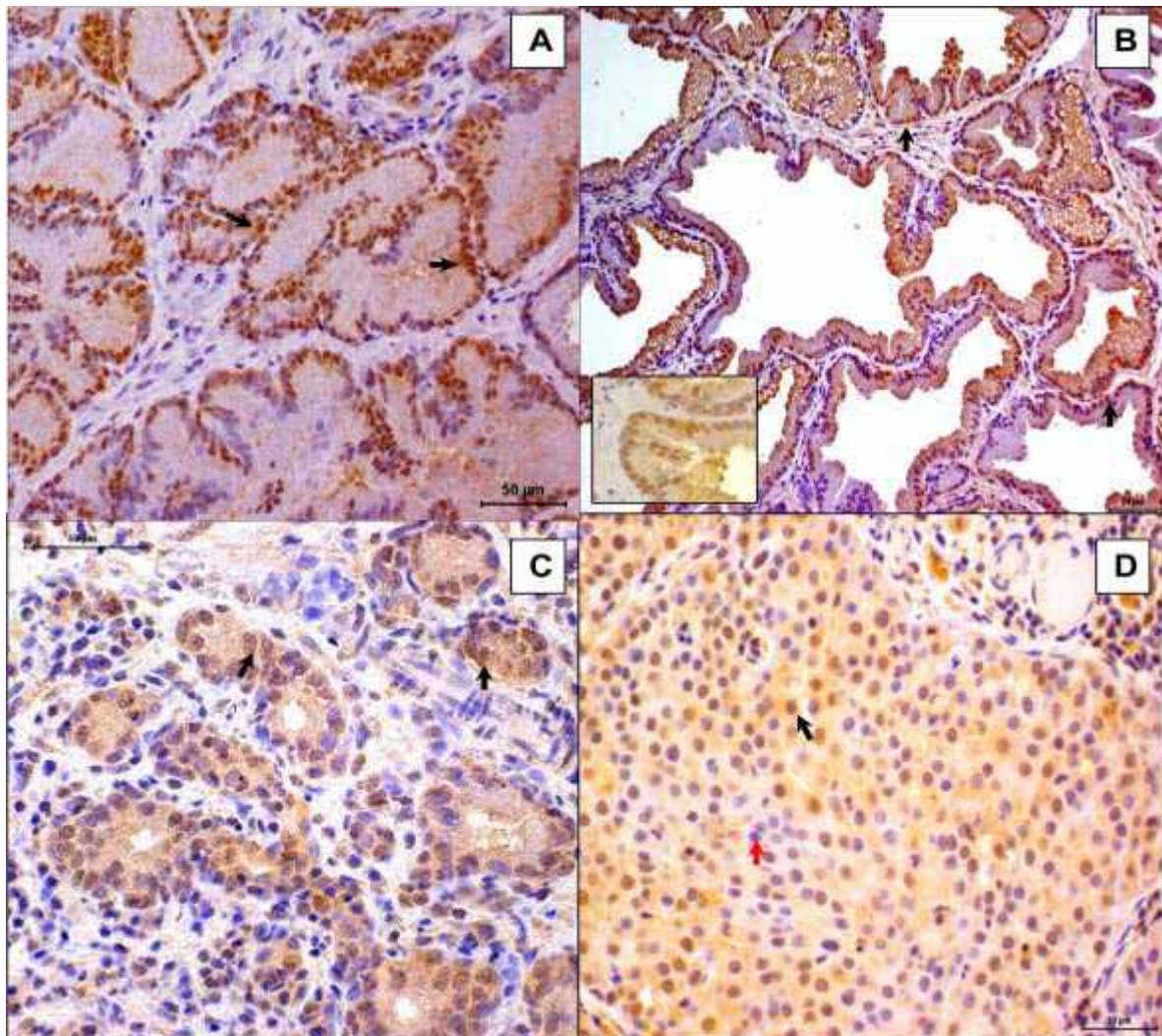
A imunomarcção nuclear pelo AR se apresentou em mais de 75% das células epiteliais normais (escore 4), de todas as amostras avaliadas (n=15). Nos CaP, se observou baixa expressão proteica, dos 11 CaP avaliados, 9 obtiveram menos de 25% das células imunomarcadas (escore 1). Ao comparar-se as amostras normais com os CaP, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 7). Na HPB o receptor andrógeno foi super-expresso (escore 4 em 100% das amostras) e teve diferença estatística com os CaPs ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 7). No tecido normal, na HPB e na PIA a intensidade de marcação nuclear foi de moderada a forte. Na PIA mais de 85% das amostras apresentaram escore 3 ou 4 e, quando se comparou o escore de distribuição da PIA com os CaPs também obteve diferença estatística significativa ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Grupos que apresentaram diferença estatística significativa quando foi comparado seu escore por distribuição na marcação de AR

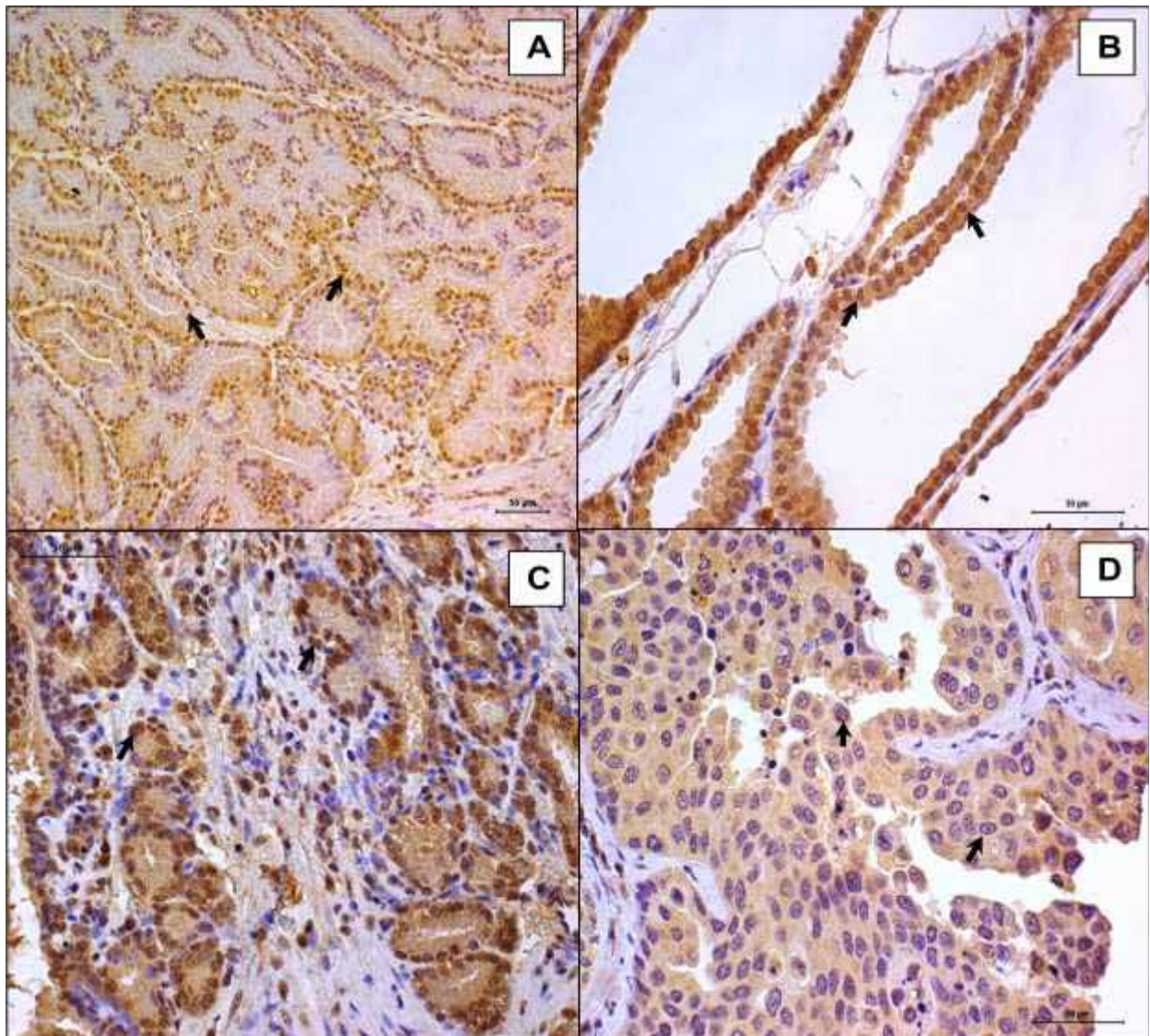
<b>Comparação entre grupos</b>			<b>p</b>
Próstata normal	Vs	CaP	<0.0001
HPB	Vs	CaP	<0.0001
PIA	Vs	CaP	<0.0001



**Figura 2.** Reação Imuno-histoquímica de PTEN na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão. **A.** Próstata normal canina, marcação citoplasmática fraca e nuclear forte (setas), (escore 4) **B.** HPB canina, marcação citoplasmática de intensidade fraca, marcação nuclear moderada (setas), escore de distribuição 3. **C.** PIA, com expressão no citoplasma e núcleo (setas) das células epiteliais. **D.** CaP do cão com ausência de marcação nuclear (seta), marcação citoplasmática forte, presença de mitose (cabeça de seta). Barra= 50  $\mu$ m.

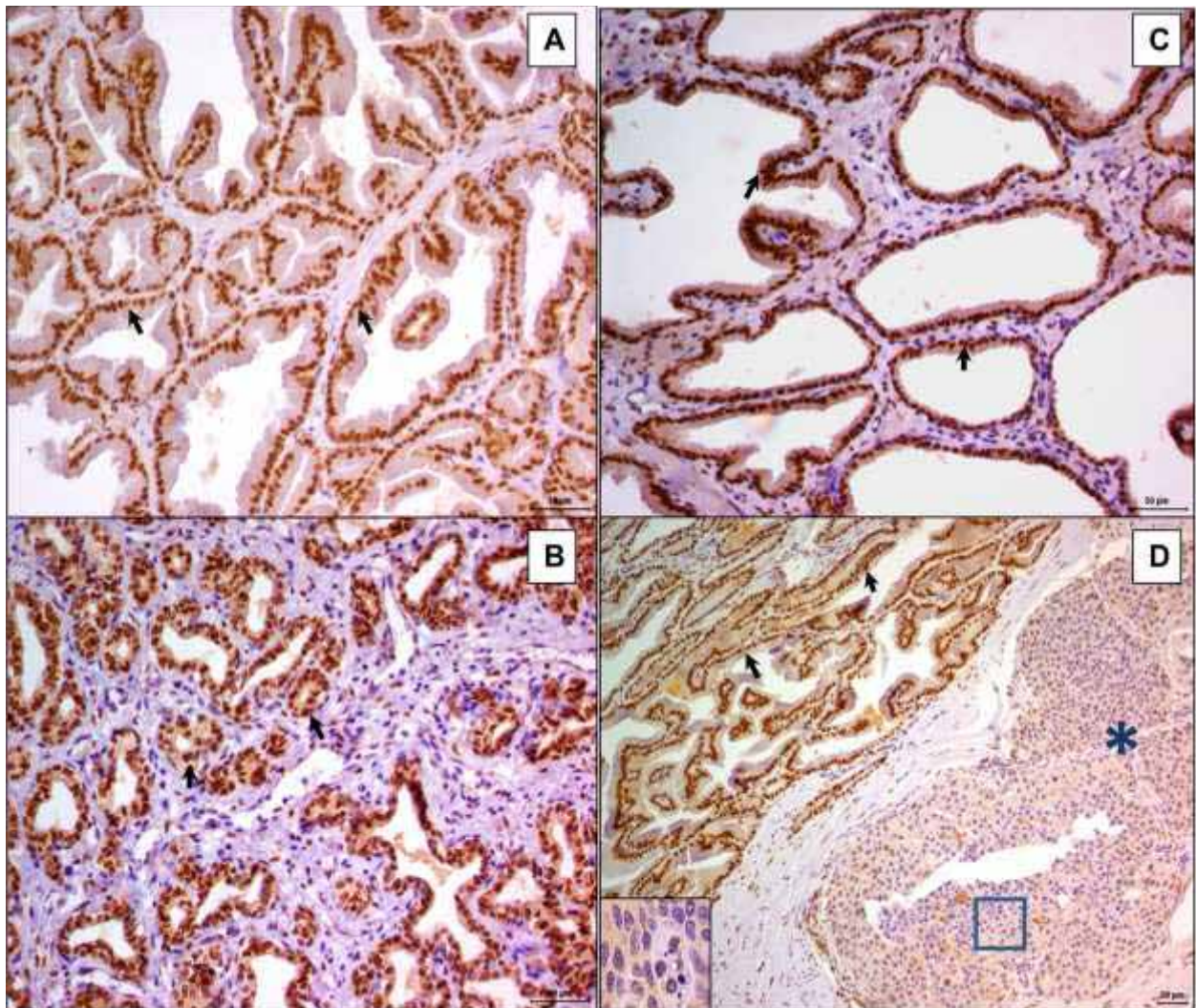


**Figura 3.** Reação imuno-histoquímica de MDM2 na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão. **A.** Próstata normal, marcação citoplasmática fraca e nuclear forte (setas) (escore 4). **B.** HPB, marcação citoplasmática de intensidade moderada, marcação nuclear forte (setas) (escore 4). **C.** PIA com imunomarcação citoplasmática fraca e marcação nuclear moderada (setas) (escore 2). **D.** CaP com expressão citoplasmática e nuclear (seta negra) em mais de 50% das células neoplásicas (escore 3). Ausência de marcação nuclear (seta vermelha). Barra= 50 μm.



**Figura 4.** Marcação imuno-histoquímica de p53 na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão. **A.** Próstata normal, marcação nuclear forte (setas) (escore 4). **B.** HPB com alta expressão nuclear (setas) (escore 4). **C.** PIA com super-expressão nuclear (setas) (escore 4). **D.** CaP com ausência de marcação nuclear nas células neoplásicas (setas). Barra= 50  $\mu$ m.





**Figura 5.** Imuno-histoquímica de AR na próstata normal e nas lesões proliferativas prostáticas do cão. **A.** Próstata normal, com super-expressão nas células epiteliais (setas) (escore 4). **B.** HPB com alta expressão nuclear (setas) (escore 4). **C.** PIA com super-expressão no núcleo das células displásicas (setas) (escore 4). **D.** CaP com ausência de marcação nuclear nas células neoplásicas (asterisco) (observar aumento da ilustração), nota-se também intensa marcação nuclear na glândula normal e hiperplásica adjacente (setas). (Barra= 50 $\mu$ m).

## 6 DISCUSSÃO

Em estudo prévio de nosso grupo, utilizando a técnica de CGHarray em lesões prostáticas do cão: hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória proliferativa (PIA), e carcinoma prostático (CaP), foram identificadas alterações no número de cópias gênicas (CNVs) na via *PTEN-MDM2-TP53*, assim como no AR (LAUFER-AMORIM, 2011). Este estudo teve o objetivo de validar os resultados prévios pela técnica de imuno-histoquímica, além de não serem encontrados dados na literatura veterinária sobre essas proteínas em lesões prostáticas do cão.

Observamos perda da expressão proteica de PTEN nos CaPs dos cães em comparação com o tecido prostático normal e a HPB. No homem já foram realizados vários estudos de expressão proteica e gênica do *PTEN* nas diferentes lesões proliferativas prostáticas, demonstrando o importante papel deste supressor tumoral no surgimento e progressão da neoplasia prostática (MCCALL et al., 2008; UZOH et al., 2009; LOTAN et al., 2013; CUI et al., 2014). Lotan et al. (2013) determinaram que mediante a imunomarcagem de PTEN era possível distinguir a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) do carcinoma intraductal prostático no homem. No PIN, o PTEN se apresentou no citoplasma de todas as células displásicas, enquanto no carcinoma intraductal prostático 84% das amostras (38/45), obtiveram perda citoplasmática deste supressor tumoral. A perda de marcação citoplasmática do PTEN nos carcinomas intraductais pode estar associada com um pior prognóstico nesses pacientes (LOTAN et al., 2013).

No Homologo de fosfatase e tensina (PTEN), localizado no cromossomo 26 do cão, foram descritas diminuição da expressão proteica em diferentes neoplasias nesta espécie, incluindo: o câncer de mama, osteossarcoma, hemangiossarcoma e melanoma (KOENIG et al., 2002; LEVINE; FOREST; SMITH, 2002; DICKERSON et al., 2005; QIU et al., 2008; THOMAS et al., 2009).

No trabalho de Qiu et al. (2008) foi avaliada a expressão proteica de PTEN em 4 glândulas mamárias normais e 50 neoplasias mamárias em cadelas (22 benignas e 28

malignas). Observou-se 100% de imunomarcção positiva de PTEN nas glândulas mamárias normais e nas neoplasias benignas, enquanto nas neoplasias mamárias malignas a marcação foi evidenciada em 67% das amostras avaliadas ( $p < 0.01$ ). Igualmente, se demonstrou que a perda de marcação de PTEN nos tumores malignos mamários esteve correlacionada com metástase nos linfonodos regionais ( $p < 0.01$ ) (QUI et al., 2008).

No carcinoma mamário, a perda de expressão imuno-histoquímica é identificada especificamente no citoplasma das células neoplásicas (QUI et al., 2008). No entanto, nosso estudo demonstrou que a perda de imunomarcção do PTEN também pode ser nuclear nas células malignas prostáticas. Essa perda pode se tornar progressiva, dependendo do grau de malignidade da doença proliferativa da próstata (houve maior expressão nuclear na HPB, seguida da PIA e do CaP).

A expressão proteica do PTEN é observada com frequência no citoplasma e no núcleo de diferentes tipos de células (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006; SALMENA; CARRACEDO; PANDOLFI, 2008). O PTEN nuclear pode ser independente da via PI3Ks/AKT e cumprir outras funções importantes, como: a regulação da integridade cromossomal, a progressão do ciclo celular, a indução de apoptose e a resposta do dano celular através da regulação de RAD51 (CHUNG et al., 2006; GIL et al., 2006; CHALHOUB; BAKER, 2009; KREIS et al., 2014).

Perdas de marcação nuclear de PTEN foram relatadas em várias neoplasias no humano, incluindo: carcinoma de células escamosas no esôfago, melanoma cutâneo, carcinoma colorretal, tumores das células das ilhotas pancreáticas e linfoma de células B (PERREN et al., 2000; TACHIBANA et al., 2002; ZHOU et al., 2002; FRIDBERG et al., 2007). A perda de expressão nuclear do PTEN foi correlacionada com a progressão tumoral (GERICKE et al., 2006; GIL et al., 2006; CHALHOUB; BAKER, 2009), semelhante ao observado em nosso estudo, em que houve uma progressão na diminuição da imunomarcção de PTEN nuclear na lesão hiperplásica (HPB), pré-neoplásica (PIA) e CaP.

Em um estudo efetuado com linhagens de células prostáticas neoplásicas dependente da proteína p53 introduzidas em ratos, se evidenciou que a presença de

PTEN nuclear foi suficiente para reduzir o crescimento do CaP. Os autores sugerem que a principal função do PTEN no núcleo é proteger as células epiteliais do dano oxidativo e do desenvolvimento de CaP (CHANG et al., 2008). Tal afirmativa pode se relacionar a progressão das lesões prostáticas do cão, uma vez que houve perda de PTEN nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, o que poderia conferir menor efeito protetor aos danos oxidativos, já descritos no processo carcinogênico da próstata canina por Croce et al. (2011).

Outra função do PTEN é bloquear a via PI3K/AKT, inibindo também a oncoproteína MDM2, envolvida no processo de sobrevivência celular e no surgimento de várias neoplasias (GERICKE; MUNSON; ROSS, 2006). Observamos diminuição da expressão de PTEN e aumento de MDM2 nos CaP dos cães, o que nos faz inferir sobre esse papel de inibição do PTEN sobre a MDM2, já que suas expressões foram inversamente proporcionais. A HPB apresentou expressão proteica de MDM2 semelhante ao tecido prostático normal, diferente da lesão pré-neoplásica (PIA) e CaP, em que houve aumento da expressão dessa proteína. A amplificação e super-expressão de MDM2, têm sido relatadas em várias neoplasias da espécie canina, como: o osteossarcoma, mastocitoma, sarcomas dos tecidos moles e tumores das glândulas hepatoides (MILLER et al., 1996; NASIR et al., 2002; NAKANO; TAURA; INOUE, 2005; WU; HAYASHI; INOUE, 2006).

Nos CaPs do cão, Laufer-Amorim (2011) identificou por CGHarray ganho do número de cópias do *MDM2* em 14.3% das amostras avaliadas (2/14), o que foi verificado em nosso estudo, com ganho de expressão proteica que ocorreu em 63.1% dos CaPs (12/19); nestes CaPs foi observado um escore de 4 de distribuição da imunomarcagem, sendo esta citoplasmática e nuclear.

A super-expressão e amplificação de MDM2 estão correlacionadas com maior risco de metástase, menor tempo de sobrevida e aumento na refração hormonal ou resistência para os antineoplásicos nos CaPs do homem (CHÈNE, 2003; YU et al., 2014b). Em nosso estudo não dispúnhamos de dados clínicos para avaliar potencial metastático e sobrevida, porém em relação a refração hormonal, os CaPs do cão se apresentaram com baixa expressão de AR, que pode estar relacionada a maior

expressão de MDM2.

Alterações gênicas de *MDM2* também podem afetar a função do *TP53*. Em condições normais, níveis baixos de p53 são degradados no citoplasma da célula por MDM2. O MDM2 inibe a atividade transcricional da p53 e causa alterações no ciclo celular, na reparação do DNA, senescência, angiogênese e apoptose (KANeko et al., 2005; PANT; LOZANO, 2014). Houve uma diminuição na expressão de p53 nos CaPs do cão (100% dos tumores com menos de 25% de células positivas para p53) em relação ao tecido prostático normal e HPB, com comportamento semelhante para a MDM2, demonstrando o descrito por Kaneko et al. 2005 e Pant e Lozano, 2014, sobre a atividade de MDM2 degradar o p53. Talvez esse seja um dos fatores que possa explicar a menor expressão de p53 nos CaPs do cão.

Laufer-Amorim (2011) também sugeriu que pode existir uma ligação entre o oncogene *MDM2* e o gene *TP53* no surgimento do CaP. No seu trabalho, dos três CaPs caninos que apresentaram perda no número de cópias do *TP53*, dois deles obtiveram ganhos genômicos envolvendo *MDM2*. Essas observações concordam com os resultados do nosso estudo, no qual, 63.1% dos CaPs avaliados evidenciaram super-expressão proteica para MDM2, em contrapartida, 100% dos CaPs apresentaram ausência de expressão nuclear para p53.

Para Ji et al. (2011) há uma forte interação entre *MDM2* e *TP53* na regulação do crescimento de células neoplásicas prostáticas do homem. Cultivos com células prostáticas PC-3 nas quais foi inibida a ação da MDM2, permitiu a redução do crescimento de células cancerígenas da próstata pela ação da proteína p53. Isso também foi comprovado em ensaios com camundongos *in vivo* (Ji et al., 2011).

Nos CaPs do homem, Leite et al. (2001) determinaram que a super-expressão de MDM2 está frequentemente associada com o incremento de proliferação celular e o aumento de volume da glândula prostática. Os autores propõem que CaPs com fenótipo MDM2/p53 positivos, apresentam um comportamento mais agressivo em comparação com os CaPs que tem baixa ou nula imunomarcagem nestas proteínas. Talvez no cão, observamos CaPs menos agressivos pelo fenótipo p53-, porém estudos correlacionando dados moleculares e clínicos com grande número de amostras devem

ser desenvolvidos.

A proteína p53 é considerada a guardiã do genoma, com função supressora tumoral em mamíferos, induzindo também à realização de apoptose ou senescência nas células que sofrem danos no DNA, para manter o equilíbrio entre a taxa de proliferação e morte celular (PANT; LOZANO, 2014).

Em nosso estudo o tecido prostático normal apresentou maior expressão de p53 do que os CaPs (com perda de expressão). Resultados diferentes foram relatados por Croce et al. (2011) que não observaram diferença de marcação da p53 entre as lesões benignas, pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata canina, porém o anticorpo primário utilizado foi diferente, sendo o monoclonal no presente estudo e policlonal no estudo de Croce et al. (2011).

É possível que no presente estudo, a perda de marcação nuclear de p53 estivesse correlacionada com a super-expressão de MDM2, a perda de expressão nuclear de PTEN ou com a mutação do *TP53*. Como foi mencionado anteriormente, o PTEN permite a proteção das células epiteliais contra o dano oxidativo e o desenvolvimento de CaP (CHANG et al., 2008). Segundo Mayo e Doner (2002), o promotor do PTEN possui um sítio de ligação na p53, e quando é ativado permite a transição do gene *PTEN*, aumentando seus níveis no citoplasma e no núcleo da célula; qualquer alteração nesta ligação gera danos irreparáveis que podem terminar em mutações celulares. Li et al. (2006) demonstraram que PTEN nuclear também pode controlar a proliferação celular mediante a acetilação de histonas e do p53. Contudo, existe grande controvérsia sobre o papel que desempenham as alterações gênicas do *TP53* nas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata, posto que, algumas destas podem estar relacionadas com ganhos ou perdas da sua função (LEITE et al., 2001; ZENG; KYPRIANOU, 2005; OREN, ROTTER, 2010).

No CaP do homem, a mutação de *TP53* é rara, apresentando-se, unicamente nos estágios avançados da doença. O *TP53* mutado foi relacionado com metástase e crescimento independente de andrógenos nessa neoplasia (KANEKO et al., 2005). Segundo Zeng e Kyprianou (2005) mutações no *TP53* conduzem à prorrogação do tempo de meia vida da proteína p53 na célula, permitindo sua avaliação mediante a

técnica de imuno-histoquímica. No entanto, neste estudo não foi observada a expressão nuclear de p53 nos 19 CaPs caninos selecionados, mas isto também não indica que essa mutação não possa existir. É necessário realizar outras técnicas moleculares como PCR para analisar o sequenciamento desses CaPs e possíveis mutações celulares.

Os CaPs do cão apresentaram menos de 25% de células positivas para AR (escore 1), demonstrando uma independência dos CaPs aos estímulos androgênicos. A perda dos receptores androgênicos foi gradativa de acordo com a lesão prostática. A PIA apresentou 85% das lesões com mais de 50% de células positivas para AR e tanto a HPB quanto a próstata normal tiveram 100% das amostras com 100% de núcleos positivos para AR. Gallardo et al., (2007) observaram perda da expressão proteica do AR nos carcinomas quando comparados com tecido normal, HPB e prostatite. Esses autores identificaram uma intensidade de marcação entre moderada e forte em mais de 95% das células epiteliais no tecido normal e hiperplásico. Nos CaPs essa expressão foi observada em 58% das células, dessa porcentagem entre 10 e 20% eram células do estroma prostático (GALLARDO et al., 2007). De forma similar, Leav et al. (2001) identificaram a expressão do AR nuclear em um dos 19 casos de CaPs estudados, enquanto nos animais com próstata normal, reprodutivamente intactos jovens (7/7) e adultos (14/14) apresentaram maior expressão nuclear.

Em homens, amostras de CaPs primários e metastáticos foram submetidas para realizar IHQ com os anticorpos para as variantes AR N-terminal e AR C-terminal, as quais foram determinadas previamente por PCR. Demonstrou-se que AR C-terminal teve perda da expressão nuclear nos carcinomas metastáticos em comparação com os carcinomas primários (ZHANG et al., 2011). Essas variações no AR, também devem ser estudadas no cão em futuras pesquisas na busca de mutações que possam ser alvo quimioterapêutico nos tumores resistentes ao tratamento com antiandrógenos.

A complexa rede PTEN/MDM2/p53 está relacionada intimamente com a via do receptor andrógeno (AR) no surgimento do CaP do homem e em animais modelos para seu estudo (CRONAUER et al., 2004; CARVER et al., 2011). Alterações da função nuclear do AR podem estar presentes quando MDM2 esta super-expresso ou

amplificado; a oncoproteína MDM2 promove a ubiquitinação e degradação proteossomal de AR (LIN et al., 2002). Enquanto a perda ou mutação do PTEN e p53 proporcionam um impacto direto na ativação independente de andrógenos por AR (GROSSMANN; HUANG; TINDALL, 2001) e no surgimento de CaPs hormônio-refratrios no homem (CONCATO et al., 2009; GUSEVA et al., 2012). Os resultados que obtivemos nos permite inferir que as alterações descritas na rede PTEN-MDM2-p53 nos CaPs do homem também poderiam estar afetando a função nuclear do AR nos CaPs do cão.



## 7 CONCLUSÕES

- Observou-se diminuição da expressão proteica de PTEN nos CaPs do cão em comparação com a próstata normal, HPB e PIA.
- Observou-se aumento da expressão proteica de MDM2 nos CaPs do cão em comparação com a próstata normal, HPB e PIA.
- Houve perda da expressão proteica de p53 nos CaPs em comparação com a próstata normal, HPB e PIA.
- No presente estudo, a perda dos receptores androgênicos foi gradativa de acordo com a lesão prostática, sendo menor nos CaPs do que no tecido prostático normal, HPB e PIA.

## 8 REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ALIMIRAH, F.; PANCHANATHAN, R.; CHEN, J.; ZHANG, X.; HO, S. Expression of Androgen Receptor Is Negatively Regulated By p53. **Neoplasia**, v. 9, n. 12, p. 1152-1159. 2007.

AKAVIA, U. D. et al. An integrated approach to uncover drivers of cancer, **The Cell**, v. 143 p. 1005-1017, 2010.

AKINLEYE, A.; AVVARU, P.; FURQAN, M.; SONG, Y.; LIU, D. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancertherapeutics. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 88, p. 1-17. 2013.

ARGYLE, D. J. Prostate cancer in dogs and men: a unique opportunity to study the diseases. **Veterinary journal**. v. 180, n. 2, p. 137-138. 2009.

BILLIS, A. Prostatic atrophy clinicopathological significance, **International Brazilian journal of urology**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 401-409, 2010.

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Moléstias prostáticas do cão. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e gato**, 3 ed., São paulo: Manole, 1992, p.1941-1963.

BASSI, C.; HO, J.; SRIKUMAR, T.; DOWLING, R. J.; GORRINI, C.; MILLER, S. J.; MAK, T. W.; NEEL, B. G.; RAUGHT, B.; STAMBOLIC, V. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. **Science**. v. 341, n. 6144, p. 395–399. 2013.

BASTAROS, J.; PLACER, J.; CELMA, A.; PLANAS, J.; MOROTE, J. Current significance of the finding of high grade prostatic intraepithelial neoplasia in the prostate biopsy. **Actas urológicas españolas**. v. 38, n. 3. 2014.

BRUDAS, K.; MCCARTHY, P. H.; FRICKE, W.; RICHTER, R. Urinary and Genital Organs, Pelvis. In: BRUDAS, K.; MCCARTHY, P. H.; FRICKE, W.; RICHTER, R. **Anatomy of the Dog**. 5 ed. Berlin: Schlütersche Verlagsgesellschaft mb H& Co, 2007. Cap. 7, p. 62-74.

BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOUND, M. J.; JOU, P.; HU, L. S.; ANDERSON, M. J. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **The Cell**, Philadelphia, v. 96, n. 857–868, 1999.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

BRYAN, J. N.; KEELER, M. R.; HENRY, C. J.; BRYAN, M. E.; HAHN, A. W.; CALDWELL, C. W., 2007. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer, **The Prostate**, Hoboken, v. 67, p. 1174–1181, 2007.

CARVER, B.; CHAPINSKI, C.; WONGVIPAT, J.; HIERONYMUS, H.; CHEN, Y.; CHANDARLAPATY, S.; ARORA, V. K.; LE, C.; KOUTCHER, J.; SCHER, H.; SCARDINO, T.; ROSEN, N.; SAWYERS, C. Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer, **Cancer Cell**, Massachusetts, v. 19, n. 5, p. 575-568, 2011.

CELMA, A.; SERVIÁN, P.; PLANAS, J.; PLACER, J.; QUILEZ, M. T.; ARBÓS, M. A.; DE TORRES, I.; MOROTE, J. Clinical significance of proliferative inflammatory atrophy in prostate biopsy. **Actas Urológicas Españolas**. v. 38, n. 2, p. 122-126. 2014.

CHALHOUB, N.; BAKER, S. J. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer, **Annual Reviews Pathology**, v, 4, p. 2-30. 2009.

CHANG, C. J.; MULHOLLAND, D. J.; VALAMEHR, B.; MOSESSIAN, S.; SELLERS, W. R.; WU, H. PTEN Nuclear Localization Is Regulated by Oxidative Stress and Mediates p53-Dependent Tumor Suppression. **Molecular and Cellular Biology**. N. 28, v. 10, p. 3281-3289. 2008.

CHATTERJEE, B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer, **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.253, p. 89–101. 2003.

CHEN Z , L.C. TROTMAN, D. SHAFFER, H.K. LIN, Z.A. DOTAN, M. NIKI, KOUTCHER, J. A.; SCHER, H. I.; LUDWIG, T.; GERALD, W.; CORDON-CARDO, C.; PANDOLFI, P. P. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis, **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725–730. 2005.

CHÈNE, P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy, **Nature Reviews Cancer**, London, v. 3, p. 102-109, 2003.

CHONG, M.; LOH, M.; THAKKAR, B.; PANG, B.; IACOPETTA, B.; SOONG, R. Phosphatidylinositol-3-kinase pathway aberrations in gastric and colorectal cancer: Meta-analysis, co-occurrence and ethnic variation. **International Journal of Cancer**. v. 134, p. 1232-1238. 2013.

CHOUCAIR, K., EJDELMAN, J., BRIMO, F.; APRIKIAN, A.; CHEVALIER, S., LAPOINTE, J. PTEN genomic deletion predicts prostate cancer recurrence and is associated with low AR expression and transcriptional activity. **BMC cancer**, v. 12, n. 543, p. 1-9. 2012.

CHOW, L. M.; BAKER, S. J. PTEN function in normal and neoplastic growth, **Cancer**

**Letters**, Philadelphia, v. 241, p. 184-196, 2006.

CHUNG, J. H.; OSTROWSKI, M. C.; ROMIGH, T.; MINAGUCHI, T.; WAITE, K. A.; ENG, C. The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle at rest by cyclin D1 transcriptional regulation. **Human Molecular Genetics**. v. 15, n. 17, p. 2553–2559. 2006.

COLLEDGE, S. L.; RASKIN, G. E.; MESSICK, J. B.; TIFFANI REED, L.; WIDE, W. L.; BALOG, K. A. Multiple joint metastasis of a transitional cell carcinoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 42, n. 2, p. 216-220. 2013.

CONCATO, J.; JAIN, D.; UCHIO, E.; RISCH, H.; LI, W. W.; WELLS, C. K. Molecular markers and death from prostate cancer. **Annals of internal Medicine**. v. 150, n. 9, p. 595-603. 2009.

CORNELL, K. K.; BOSTWICK, D. G.; COOLEY, D.; HALL, G.; HARVEY, H. J.; HENDRICK, M. J.; PAULI, B. U.; RENDER, J. A.; STOICA, G.; SWEET, D. C.; WATERS, D. J. Clinical and pathology aspect of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**. v. 45, n. 2, p. 173-183. 2000.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867.

CRAWFORD, E. D.; ROVE, K. O.; TRABULSI, E. J.; QIAN, J.; DREWNOWSKA, K. P.; KAMINESTSKY, J. C.; HUISMAN, T. K.; BILOWUS, M. L.; FREEDMAN, S. J.; GLOVER, W. L.; BOSTWICK, D. G. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1962 cases. **The Journal Urology**. v. 188, n. 5, p. 1726-1731. 2012.

CROCE, G. B.; RODRIGUES, M. M.; FALEIRO, M. B.; MOURA, V. M.; LAUFER-AMORIM, R. Óxido nítrico, GSTP-1 e p53: qual o papel desses biomarcadores nas lesões prostáticas do cão?. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n. 6, p. 1368-1376, 2011.

CRONAUER M. V.; SCHULZ, W. A.; BURCHARDT, T.; ACKERMANN, R.; BURCHARDT, M. Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. **Oncogene**, v. 23, n. 20, p. 3541-3549. 2004.

CUI, M.; AUGERT, A.; RONGIONE, M.; CONKRITE, K.; PARAZZOLI, S.; NIKITIN, A. Y.; INGOLIA, N.; MACPHERSON, D. PTEN is a potent suppressor of small cell lung cancer. **Molecular Cancer Research**. 2014. Disponível em: <http://mcr.aacrjournals.org/content/suppl/2014/01/31/1541-7786.MCR-13-0554.DC1.html>. Acesso em: 15 de fev. 2014.

CUI, W.; CAI, Y.; ZHOU, X. Advances in subunits of PI3K class I in cancer. **Pathology**, v. 46, n.3, p. 169-176. 2014.

DATTA, S. R.; DUDEK, H.; TAO, X.; MASTERS, S.; FU, H.; GOTOH, Y. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **The Cell**, Philadelphia, v.91, p. 231–241, 1997.

DE ASSIS, L. M. V. The function, mechanisms, and role of the genes PTEN and TP53 and the effects of asbestos in the development of malignant mesothelioma: a review focused on the genes molecular mechanisms. **Tumor Biology**. v. 35, p. 889-901. 2014.

DE MARZO, A. M; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis, **American Journal Pathology**, Philadelphia, v.155, n. 6, p.1985-1992, 1999.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in Prostate carcinogenesis, **Nature Publishing Group**, London, v. 7, p. 256-269, 2007.

DE MOURA, D.: SANTIS, G.; AMORIM, R.; BALIEIRO, J. C.; BANDARRA, E. Mensuração de hormônios andrógenos, estrógeno, fosfatase ácida prostática (PAP) e antígeno prostático específico (PSA) em cães adultos com próstata normal e hiperplásica, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 65-73, 2006.

DICKERSON, E. B.; THOMAS, R.; FOSMIRE, S. P.; LAMERATO-KOZICKI, A. R.; BIANCO, S. R.; WOJCIESZYN, J. W.; BREEN, M.; HELFAND, S. C.; MODIANO, J. F. Mutations of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 in canine hemangiosarcoma, **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 42, p. 618-632, 2005.

DONEHOWER, L.A.; HARVEY, M.; SLAGLE, B. L.; MCARTHUR, M. J.; MONTGOMERY, C. A.; BUTEL, J. S.; BRADLEY, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal ut susceptible to spontaneous tumours. **Nature**. v. 356, n. 6366, p. 215–221. 1992.

EROSCHENKO, V. P. Male reproduction system. In: EROSCHENKO, V. P (Eds). **Difiore's Atlas of Histology with Function correlations**. 11 ed. Lippincott Williams and Wilkins: Baltimore. 2008. Cap 18.

EVANS, H.; LAHUNTA, A. The Urogenital System. In: EVANS, H.; LAHUNTA, A (eds). **Miller's Anatomy of the dog**. 4 ed. Elsevier Saunde: St. Louis. 2013. Cap. 9. p. 316-398.

FELGUEIRAS, J.; SILVA, J.; FARDILHA, M. Prostate cancer: the need for biomarkers and new therapeutic targets. **Journal of Zhejiang University**. v. 16, n. 1, p. 16-42. 2014.

FISHER, G.; YANG, Z. H.; KUDAHETTI, S.; MOLLER, H.; SCARCINO, P.; CUZICK, J.; BERNEY, D. M.; TRANSATLANTIC PROSTATE GROUP. Prognostic value of Ki-67 for prostate cancer death in a conservatively managed cohort. **British Journal Cancer**, v. 108, n. 2, p. 271-277. 2013.

FONSECA-ALVES, C. E.; FALEIRO, M. B.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V. M. B. D. Avaliação Histológica da Próstata de Cães Adultos Sexualmente Intactos, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo horizonte, v. 62, p. 596-602, 2010.

FONSECA-ALVES C. E.; RODRIGUES, M. M.; DE MOURA, V. M.; ROGATTO S. R.; LAUFER-AMORIM, R. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis, **Microscopy Research Technique**, Malden USA, v. 76, p. 1250-1256, 2013.

FOSTER, R. A.; LADDS, P. W. Male genital system. In: MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy, Palmer's Pathology of domestic animals**. 5.ed. Ontario: Saunders, 2007. v. 3, cap. 5, p. 565-617.

FOSTER, R. A. Sistema reprodutivo do macho. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**.(Editores). 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. Seção II. cap. 19. p.1317-1348.

FRIDBERG, M.; SERVIN, A.; ANAGNOSTAKI, L.; LINDEROTH, J.; BERGLUND, M.; SODERBERG, O.; ENBLAD, G.; ROSEN, A.; MUSTELIN, T.; JERKEMAN, M.; PERSSON, J. L.; WINGREN, A. G. Protein expression and cellular localization in two prognostic subgroups of diffuse large B-cell lymphoma: Higher expression of ZAP70 and PKC-beta II in the non-germinal center group and poor survival in patients deficient in nuclear PTEN. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 11, p. 2221–2232. 2007.

GALLARDO, F.; MOGAS, T.; BARO, T.; RABANAL, R.; MOROTE, J.; ABAL, M. et al. Expression of androgen, oestrogen alpha and beta, and progesterone receptors in the canine prostate: differences between normal, inflamed, hyperplastic and neoplastic glands, **The Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v. 136, n. 1, p. 1–8, 2007.

GALLARDO, F.; LLORETA, J.; GARCÍA, F.; MOLL, X.; BARÓ, T.; GONZALEZ, L. A. Immunolocalization of Androgen Receptors, Estrogen  $\alpha$  and Estrogen  $\beta$  Receptors in Experimentally Induced Canine Prostatic Hyperplasia, **Journal of Andrology**, v. 30, n. 3, p. 244-246, 2009.

GAUGHAN, L.; LOGAN, I. R.; NEAL, D. E.; ROBSON, C. N. Regulation of androgen receptor and histone deacetylase 1 by Mdm2-mediated ubiquitylation, **Nucleic Acids Research**. v. 33, n. 1, p. 13-26. 2006.

GELMANN, E. P. Molecular biology of the androgen receptor. **Journal Clinical Oncology**. v. 20, n. 13, p: 3001–3015, 2002.

GERICKE, A.; MUNSON, M.; ROSS. Regulation of the PTEN phosphatase. **Gene**, Philadelphia, v. 374, p. 1-9, 2006.

GIL, A.; ANDRES-PONS, A.; FERNANDEZ, E.; VALIENTE, M.; TORRES, J.; CERVERA, J.; PULIDO, R. Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. **Molecular Biology of the Cell**. v.17, n. 9, p. 4002–4013. 2006.

GRAUPERA, M.; POTENTE, M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. **Experimental cell research**. v. 319, n, 9, p. 1348-1355. 2013.

GRIECO, V.; PATTON, V.; ROMUSSI, S.; FINAZZI, M. Cytokeratin and vimentin expression in normal and neoplastic canine prostate, **Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v. 129, n. 1, p. 78-84, 2003.

GROSSMANN, M. E.; HUANG, H.; TINDALL, D. Androgen Receptor Signaling in Androgen-Refractory Prostate Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 22, p. 1687-1697, 2001.

GUSEVA, N. V.; ROKHLIN, O. W.; BAIR, T. B.; GLOVER, R. B.; COHEN, M. B. Inhibition of p53 expression modifies the specificity of chromatin binding by the androgen receptor. **Oncotarget**, v. 3, n. 2, p. 183-194. 2012.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; MANSON, M.; MATVEET, V.; MOTTET, N.; SCHIMID, H. P.; VAN DER KWAST, T.; WIEGEL, T.; ZATTONI, F.; EUROPEAN ASSOCIATION OF UROLOGY. EUA guidelines on prostate cancer: Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinical localised disease. **European Urology**. v. 59, n. 1, p. 61-71. 2011.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. INCA-Ministério da Saúde, Rio de Janeiro. 2013. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>>. Acesso em: 28fev. 2014

JACOBS, T. M.; HOPPE, B. R.; POEHLMANN, C. E.; PINKERTON, M. E.; MILOVANCEV, M. Metastasis of a Prostatic Carcinoma along an Omental Graft in a Dog. **Case Reports in Veterinary Medicine**. v. 2013, Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/crivem/2013/141094/>>. Acesso em 25 fev. 2014.

JI, K.; WANG, B.; SHAO, Y.; ZHANG, L.; LIU, Y.; SHAO, C., LI, X.; LI, X.; HU, J.; ZHAO, X.; XU, D.; LI, Y., CAI, L. Synergistic supression of prostatic cancer cells by coexpression of both *Murine Double Minute 2* Small interfering RNA and Wild-Type *p53* Gene In Vitro and In Vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 173-183, 2011.

JOHNSTON, S. D.; BARSANTI, J.; ROOT-KUSTRITZ, M. V.; JOHNSTON, G. R. Prostatic disorders in dog, **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 405-415, 2000.

JONES, S. N.; ROE, A. E.; DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. **Nature**. v. 378, p. 206–208. 1995.

JUVEN-GERSHON, T.; OREN, M. Mdm2: the ups and downs. **Molecular Medicine**, v. 5, n. 2, p. 5, 71–83. 1999.

KANEKO, N.; OKUDA, M.; TOYAMA, N.; OIKAWA T.; WATANABE, M.; KANAYA, N.; YAZAWA, M.; HASEGAWA, K.; MORIMOTO, M., HAYASHI, T.; UNE, S.; NAKAICHI, M., TAURA, Y.; TSUJIMOTOH, INOKUMA, H. Detection of centrosome amplification as a surrogate marker of dysfunction in the p53 pathway-p53 gene mutation or MDM2 overexpression. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 3, n. 4, p. 203-210, 2005.

KATSO, R.; OKKENHAUG, K.; AHMANDI, K. et al. Cellular Function Phosphoinositide 3-Kinases: Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer, Philadelphia, **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 17, p. 615-675, 2001.

KELLER, J. M.; SCHADE, G, R; IVES, K.; CHENG, XU.; ROSOL, T. J.; PIERT, M. SIDDIQUI, J.; ROBERTS, W. W.; KELLER, E. T. A novel canine model for prostate cancer. **The prostate**. v. 73, n. 9, p. 952-959. 2013.

KLEIN, C; VASSILEV, L. T. Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer, **British Journal of Cancer**, London, v. 91, n. 8, p. 1415–1419, 2004.

KOENIG, A.; BIANCO, S. R.; FOSMIRE, S.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. F. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma, **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 39, n. 4, p. 458-472, 2002.

KÖNING, H. E.; MAIERL, J.; LIEBICH, H. G. Órganos urinarios. In: KÖNING, H. E.;



LIEBICH, H. G. **Anatomía de los Animales Domésticos**. 2 ed. Madrid: Panamericana, 2005. v. 2, cap. 9, p. 103-152.

KREIS, P.; LEONDARITIS, G.; LIEBERAM, I.; EICKHOLT, B. J. Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders, **Frontiers in Molecular Neuroscience**. v. 7, n. 1, p. 1-19. 2014.

LAI, C.; VAN DEN HAM, R.; MOL, J.; TESKE, E. Immunostaining of the androgen receptor and sequence analysis of its DNA-binding domain in canine prostate cancer. *The Journal Veterinary*. v. 181, p. 256-260. 2009.

LAI, C.; VAN DEN HAM, R.; VAN LEENDERS, G.; VAN DER LUGT, J.; TESKE, E. Comparative characterization of the canine normal prostate in intact and castrated animals, **The Prostate**, Hoboken, v. 68, p. 498-507, 2008.

LAUFER-AMORIM, R. **Alterações no número de cópias genômicas em lesões proliferativas, pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata do cão**. Botucatu. 2011. 286 f. Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Livre Docente. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2011.

LEAV, I.; SCHELLING, K. H.; ADAMS, J. Y.; MERK, F. B.; ALROY, J. Role of canine basal cells in postnatal prostatic development, induction of hyperplasia, and sex hormone-stimulated growth; and the ductal origin of carcinoma, **The Prostate**, Hoboken, v. 48, n. 3, p. 210–224, 2001.

LEITE, K.; FRANCO, M. F.; SROUGI, M.; NESRALLAH, L. J.; NESRALLAH, A; BEVILACQUA, R. G.; DARINI, E.; CARVALHO, C. M.; MEIRELLES, M. I.; SANTANA, I.; CAMARA-LOPES. Abnormal Expression of MDM2 in Prostate Carcinoma. **Modern Pathology**, v. 14, n. 5, p. 428-436, 2001.

LEROY, B. E.; NADELLA, M. V.; TORIBIO, R. E.; LEAV, I.; ROSOL, T. J. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation, **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 41, n. 2, p. 131–140, 2004.

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

LEROY, B.; ANDERSON, M.; SOUSSI, T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. **Human mutation**. (Aceito para publicação). 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/humu.22552>>.

LEVAV-COHEN, Y.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. Mdm2 in growth signaling and cancer, **Growth Factors**, London, v. 23, n. 3, p. 183-192, 2005.

LEVINE, R. A.; FOREST, T.; SMITH, C. Tumor Suppressor PTEN is Mutated in Canine

Osteosarcoma Cell Lines and Tumors, **Veterinary Pathology Online**, Thousand Oaks, v. 39, p. 372-378, 2002.

LI, J.; YEN, C.; LIAW, D.; PODSY PANINA, K.; BOSE, S.; WANG, S. I.; PUC, J.; MILIARESIS, C.; RODGERS, L.; MCCOMBIE, R.; BIGNER, S. H.; GIOVANELLA, B. C.; ITTMANN, M.; TYCKO, B.; HIBSHOOSH, H.; WIGLER, M. H.; PARSONS, R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science**, v. 275, n. 5308, p. 1943–1947. 1997.

LI, A. G.; PILUSO, L. G.; CAI, X.; WEI, G.; SELLERS, W. R.; LIU, X. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. **Molecular Cell**. v. 23, p. 575–587. 2006.

LIN, H. K.; WANG, L.; HU, Y. C.; ALTUWAIJRI, S.; CHANG, C. Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. **The EMBO Journal**. v. 21, n. 2002, p. 4037-4048. 2002.

LIN, H. K.; HU, Y. C.; LEE, D. K.; CHANG, C. Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells. **Molecular Endocrinology**. v. 18, n. 10, p. 2409–2423. 2004.

LINJA, M. J.; SAVINAINEN, K. J.; SARAMAKI, O. R.; TAMMELA, T. L.; VESSELLA, R. L.; VISAKORPI, T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Research**, v. 61, p. 3550–3555. 2001. Disponível em: <<http://cancerres.aacrjournals.org/content/50/3/735.full.pdf+html>>. Acesso em: 22 de fev. de 2014.

LIU, F.; WAGNER, S.; CAMPBELL, R. B.; NICKERSON, J. A.; SCHIFFER, C.A.; ROSS, A. H. PTEN enters the nucleus by diffusion, **Journal of Cellular Biochemistry**, Malden, v. 96, p. 221–234. 2005.

LIU, P.; CHENG, H.; ROBERTS, T. M.; ZHAO, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer, **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 8, p. 627-644, 2009.

LOTAN, T. L.; GUMUSKAYA, B.; RAHIMI, H.; HICKS, J.; IWATA, T.; ROBINSON, B. D.; EPSTEIN, J. Cytoplasmic PTEN protein loss distinguishes intraductal carcinoma of the prostate from high grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern Pathology**, v. 26, n. 4, p. 587-603, 2013.

MACLACHLAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the Genital Systems. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa: Iowa State Press, 2004. cap. 11, p. 547-606.

MACLENNAN, G. T.; EISENBERG, R.; FLESHMAN, R. L.; TAYLOR, J. M.; FU, P.; RESNICK, M. I. et al. The Influence of Chronic Inflammation in Prostatic Carcinogenesis: A 5-Year Follow up Study, **Journal of Urology**, Philadelphia, v. 176, p. 1012-1016, 2006.

MAKAROV, D. V.; LOEB, S.; GETXENBERG, R. H.; PARTIN, A. W. Biomarkers for prostate cancer. **Annual Review of Medicine**. v. 60. p. 1-13. 2009.

MANFREDI, J. J. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as na oncogene and a tumor suppressor. **Genes & development**. 2010. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/24/15/1580.full.html#ref-list-1>>. Acesso em: 25 de Jan. de 2014.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **The Cell**, Philadelphia, v. 129, p. 1261-1274. 2007.

MAYO, L. D.; DIXON, J. E.; DURDEN, D. L.; TONKS, N. K.; DONNER, D. B. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, n. 7, p. 5484–5489. 2002.

MAYO, L. D.; DONNER, D. B. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. **TRENDS in Biochemical Sciences** v. 27, n. 9, p. 462-467. 2002.

MATSUZAKI, P.; COGLIATI, B.; SANCHES, L. M.; CHAIBLE, K. C.; SILVA, T. C.; REAL-LIMA, M. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, E. J.; LAUFER-AMORIM, R.; DAGLI, M. L. Immunohistochemical Characterization of Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia. **Journal Comparative Pathology**. v. 142, p. 84-88. 2010.

MCCALL, P.; WITTON, C. J.; GRIMSLEY, S.; NIELSEN, K. V.; EDWARDS, J. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer, **British Journal of Cancer**, London, v. 99, p. 1296-1301, 2008.

MEMOM, M. A. Common causes of male dog infertility, **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, p. 322-328, 2007.

MENG, F.; LIU, L.; CHIN, P. C.; D'MELLO, S. R. Akt is a downstream target of NF-kappa B, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29674-29680. 2002.

MERIC-BERNSTAM, F.; GONZALES-ANGULO, A. M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, Alexandria, v. 27, p. 2278, 2009.

MILLER, C. W.; ALSO, A.; WON, A.; TAN, M.; LAMPKIN, B.; KOEFFLLER, H. P. Alterations of p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. **Journal Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 122, n. 9, p. 559-565. 1996.

NAKANO, M.; TAURA, Y.; INOUE, M. Protein expression of Mdm2 and p53 in hyperplastic and neoplastic lesions of the canine circumanal gland. **Journal Comparative Pathology**, v. 132, n. 1, p. 27-32.

NARUSE, K.; YAMADA, Y.; AOKI, S.; TAKI, N.; NAKAMURA, K.; TOBIUME, M.; ZENNAMI, K.; KATSUDA, R.; SAI, S.; NISHIO, Y.; INOUE, Y.; NOGUCHI, H.; HONDAI, N. Lactatedehydrogenase is a prognostic indicator for prostate cancer patients with bone metastasis. **Hinyokika Kyo**, v. 53, n. 5 p. 287-292. 2007.

NASCIMENTO, E.; SANTOS, R.; EDWARDS, J. F. Sistema Reprodutivo Masculino. In: SANTOS, R. L.; ALESSI, A.C. (eds). **Patologia Veterinária**. São Paulo: Roca. 2011. Cap 15. p. 855-880.

NASIR, L.; RUTTEMAN, G. R.; REID, S. W. J.; SCHULZE, CH.; ARGYLE, D. J. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas, *Cancer Letters*, v. 117, p. 83-89. 2001.

NELSON, W.; DE MARZO, A. M.; DEWEESE, T. L. The molecular pathogenesis of prostate cancer: implications for prostate cancer prevention, **Journal of Urology**, Philadelphia, v. 57, p. 39-45, 2001.

NICHOLSON, T. M.; RICKE, W. A. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: Past, Present and future, **Differentiation**, Philadelphia, v. 82, p. 184-199, 2011.

NUNZIO, C. D.; KRAMER, G.; MARBERGER, M.; MONTIRONI, R.; NELSON, W.; SCHRODER, F. et al. Controversial Relationship Between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: The Role of Inflammation, **European Urology**, Amsterdam, v. 60, p. 106-117, 2011.

OREN, M.; ROTTER, M V. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**. 2010. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/2/2/a001107.full.pdf+html>>. Acesso em: 20 de fev. de 2014.

OWONIKOKO, T. K.; KHURI, F. R. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway: Biomarkers of Success and Tribulation. **American Society of Clinical Oncology educational book/ASCO**. 2013. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC3821994/pdf/nihms510755.pdf](http://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC3821994/pdf/nihms510755.pdf)>. Acesso em: 28 de fev. 2013.

PANT, V.; LOZANO, G. Dissecting the p53-Mdm2 feedback loop *in vivo*: uncoupling the role in p53 stability and activity. **Oncotarget**. 2014. Disponível em: <<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=1797&path%5B%5D=2226>>. Acesso em: 15 de fev. 2013.

PARSONS, J.K.; GAGE, W.R.; NELSON, W.G.; DE MARZO, A. p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. **Urology**, v. 58, n. 4, p. 619-624. 2001.

PERLETTI, G.; MONTANATI, E.; VRAL, A.; GAZZANO, G.; MARRAS, E.; MIONE, S.; MAGRI, V. Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: "Fertileground" for prostate cancer development?. **Molecular medicine reports**. v. 3, p. 3-12, 2010.

PERREN, A.; WENG, LP; BOAG, A. H.; ZIEBOLD, U.; THAKORE, K.; DAHIA, P. L. M; KOMMINOTH, P.; LEES, J. A.; MULLIGAN, L. M.; MUTTER, G. L.; ENG, C. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast. **The American Journal of Pathology**. v. 155, n. 4. p. 1253-1260. 1999.

PURSWELL, B. J.; PARKER, N. A.; FORRESTER, S. D. Prostatic diseases in dog: a review, **Medicine Veterinary**, Philadelphia, v. 95, p. 315-321, 2000.

QIU, C. W; LIN, D. G.; WANG, J. Q.; LI, C. Y.; DENG, G. Z. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours, **Veterinary Research Communications**, New York, v. 32, p. 463-472, 2008.

QUARMBY, V. E.; BECKMAN W. C.; COOKE, D.B.; LUBAHN, D.B.; JOSEPH, D. R.; WILSON, E. M.; FRENCH, F. S. Expression and localization of androgen receptor in the R-3327 Dunning rat prostatic adenocarcinoma. **Cancer Research**. v. 50, p. 735-739. 1990.

ROSOL, T. J.; TANNEHILL-GREGG, S. H.; CORN, S.; SCHNEIDER, A.; MCCAULEY, L. K. 2004. Animal models of bone metastasis. **Cancer Treatment and Research**, v. 118, p. 47-81. 2004.

RODRIGUES, M.; DI SANTIS, G. W.; DE MOURA, V.; AMORIM, R. L. COX-2 and TGF- $\beta$  expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**. v. 3, n. 1, 2010. p. 31-36.

RODRIGUES, M.; REMA, A.; GARTNER, M. F.; LAUFER-AMORIM, R. Role of adhesion molecules and proliferation hyperplastic, préneoplastic and neoplastic lesions in canine prostate. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 16, n. 21, p. 1324-1329. 2013.

ROOT-KUSTITZ M, J.; KLAUSNER. Prostatic disease. In: ETTINGER S.; FELDMAN, E. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 5 ed. WB Saunders, Philadelphia: WB Saunders, 2000. p. 1687-1696.

ROYUELA, M.; DE MIGUEL, M. P.; BETHENCOURT, F. R.; SANCHEZ-CHAPADO, M.; FRAILE, B.; ARENAS, M. I. et al. Estrogen receptors alpha and beta in the normal, hyperplastic and carcinoma to us human prostate, **Journal of Endocrinology**, v. 168, p. 447–454, 2001.

RUSKA, K. M.; SAUVAGEOT, L.; EPSTEIN, J. I. Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. **American Journal Surgical Pathology**, Philadelphia, v.22, p.1073-1077, 1998.

SALMENA, L.; CARRACEDO, A.; PANDOLFI, P. P. Tents of PTEN Tumor Supression, **The Cell**, Philadelphia, v. 133, p. 403-414, 2008.

SHAFI, A. A.; YEN, A. E.; WEIGEL, N. L. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. **Pharmacology & therapeutics**. v. 140, n. 3, p. 223-238. 2013.

SHARMA, M.; CHUAN, W. W.; SUN, Z. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Stimulates Androgen Pathway through GSK3 $\beta$  Inhibition and Nuclear  $\beta$ -Catenin Accumulation. **The Journal of biological chemistry**. v. 277, n. 34, p.30935-30941.

SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment, **Theriogenology**, Philadelphia, v. 70, n. 3, p. 375-383, 2008.

SORENMO, K. U.; GOLDSCHIMDT, M.; SHOFER, F.; GOLDKAMP, C.; FERRACONE, J. Immunohistochemical characterization of canine prostatic carcinoma and correlation with castration status and castration time, **Veterinary of Comparative Oncology**, Malden, n. 1, v. 1, p. 48-56, 2003.

SORENMO, K. U.; GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S.; GOLDKAMP, C.; FERRACONE, J. Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 2, n. 1, p. 13–23. 2004.

STAMBOLIC, V.; MACPHERSON, D.; SAS, D.; LIN, Y.; SNOW, B.; JANG, Y.; BENCHIMOL, S.; MAK, T. X. Regulation of PTEN transcription by p53. **Molecular Cell**. v. 8, n. 2, p. 317–325. 2001.

SUGAR, L. M. Inflammation and prostate cancer, **Canadian Journal of Urology**, Quebec, v.13, n.1, p.46-47, 2006.

SZCZYRBA, J.; NOLTE, E.; WACH, S.; KREMMER, E.; STOHR, R.; HARTMANN, A.; WIELAND, W.; WULLICH, B.; GRASSER, F. A. Downregulation of Sec23A protein by miRNA-375 in prostate carcinoma. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 791-800. 2011.

TACHIBANA, M.; SHIBAKITA, M.; OHNO, S.; KINUGASA, S.; YOSHIMURA, H.; UEDA, S.; FUJII, T.; RAHMAN, M. A.; DHAR, D. K.; NAGASUE, N. Expression and prognostic significance of PTEN product protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 7, p. 1955–1960. 2002.

TAMURA, M; GU, J; TRAN, H; YAMADA, K. M. PTEN Gene and Integrin Signaling in Cancer, **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 91, n. 21, 1999.

TERAZAKI, P. M. **Caracterização da próstata canina quanto a aspectos na evolução para o carcinoma prostático**. 2009. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TESKE, E.; NAAN, E. C.; VAN DIJK, E. M.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J. A. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs, **Molecular and Cellular Endocrinology**, Philadelphia, v. 197, p. 251-255, 2002.

THOMAS, R.; WANG, H. J.; TSAI, P.; LANGFORD, C. F.; FOSMIRE, S. P.; JUBALA, C. M.; GETZY, D. M.; CUTTER, G. R.; MODIANO, J. F.; BREEN, M. Influence of genetic background on tumor karyotypes: Evidence for breed-associated cytogenetic aberrations in canine appendicular osteosarcoma. **Chromosome Research**, v. 17, n. 3, p. 365-377, 2009.

TIMMS, B. G.; HOFKAMP, L. E. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia, **Differentiation**, Philadelphia, v. 82, p. 173-177, 2011.

TOMAS, D.; KRUŠLIN, B.; ROGATSCH, H.; SCHÄFER, G.; BELICZA, M.; MIKUZ, G. Different Types of Atrophy in the Prostate With and Without Adenocarcinoma, **European Urology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 98-104, 2007.

TOLEDO, D. L.; RODRIGUES, M. B.; PINTO, M. M.; WINGETER, G.; LAUFER, R.; DIGNANI, V. M. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina, **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1372-1377, 2010.

TOVAR, C.; HIGGINS, B.; KOLINSKY, K.; XIA, M.; PACKMAN, K.; HEIMBROOK, D. C.; VASSILEV, L. T. MDM2 antagonists boost antitumor effect of androgen withdrawal: implications for therapy of prostate cancer, **Molecular cancer**, London, v. 10, n. 49, p. 1-11, 2011.

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

TROTMAN, L.C., NIKI, M., DOTAN, Z.A., KOUTCHER, J.A., DI CRISTOFANO, A., XIAO, A., KHOO, A.S., ROY-BURMAN, P., GREENBERG, N.M., VAN DYKE, T., CORDON-CARDO, C.; PANDOLFI, P. P. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. **PLoS Biology**, v. 1, n. 3, p. 385-396. 2003.

UZOH, C. C.; PERKS, C. M.; BAHL, A.; HOLLY, J. M.; SUGIONO, M.; PERSAD, R. A. PTEN-mediated pathways and their association with treatment-resistant prostate cancer. **Journal BJU International**, v. 104, n. 4, p. 556-561. 2009.

VAN OIJEN, M. G.; SLOOTWENG, P. J. Gain-of-function in the tumor suppressor gene p53. **Clinical Cancer Research**. 2000. <<http://clincancerres.aacrjournals.org/content/6/6/2138.full.html#ref-list-1>>. Acesso em: 10 de fev. de 2014.

VARA, J. A. F.; CASADO, E.; DE CASTRO, J.; CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C. PI3K/Akt signalling pathway and cancer, **Cancer Treatment Reviews**, Philadelphia, v. 30, p. 193-204, 2004.

VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, A. H.; SWANEN, A. C.; HYYTINEN, E. R.; KARHU, R.; TAMMELA, T.; ISOLA, J. J.; KALLIONIEMI, O. P. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. **Cancer research**, v. 55, p. 342-347, 1995a.

VISAKORPI, T.; HYYTINEN, E. R.; KOIVISTO, P.; TANNER, M.; KEINANEN, R.; PALMBERG, C.; PALOTIE, A.; TAMMELA, T.; ISOLA, J.; KALLIONIEMI, O. P. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. **Nature genetics**. v. 9, n. 4, p. 401-406. 1995b.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol-3-kinase-akt pathway in human cancer. **Nature reviews**, London, v. 2, p. 489-501, 2002.

WAGENLEHGER, F. M.; ELKAHWAJI, J. E.; ALGABA, F.; BJERKLUND-JOHANSEN, T.; NABER, K. B.; HARTUNGS, R.; WEIDNER, W. The role of inflammation and infection in the pathogenesis of prostate carcinoma, **Journal BJU International**, Malden, v. 100, p. 733-737, 2007.

WANG, S.I; PARSONS, R.; ITTMANN, M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in subset of prostate adenocarcinomas. **Clinical Cancer Research**. v. 4, p. 811-815. 1998.



WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J. Morphological Transition of Proliferative Inflammatory Atrophy to High-Grade Intraepithelial Neoplasia and Cancer in Human Prostate, **The Prostate**, Hoboken, v. 69, p. 1378-1386, 2009.

WANG, Y.; ROMIGH T.; HE, X.; TAN, M. H.; ORLOFF, M. S.; SILVERMAN, R. H.; HESTON, W. D.; ENG. C. Differential regulation PTEN expression by androgen receptor in prostate and breast cancer. **Oncogene**. v. 30, n. 42, p. 4321-4338. 2011.

WATANABE, R.; WEI, L.; HUANG, J. mTOR signaling, function, novel inhibitors, and therapeutic targets. **Journal of Nuclear Medicine**, Herndon, v. 52, n. 4, p. 497-500. 2011.

WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. WHO-IARC, Lyon, 2014. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)>. Acesso em: 28 fev. 2014.

WINKLER, S.; ESCOBAR, H. M.; MEYER, B.; SIMON, D.; EBERLE, N.; BAUMGARTNER, W.; LOESCHKE, S.; NOLTE, I.; BULLERDIEK, J. HMGA2 expression in a canine model of prostate cancer. **Cancer genetics and cytogetics**, v. 177, n. 2, p. 98-102, 2007.

WOODSON, K.; O'REILLY, K. J.; HANSON, J. C.; NELSON, D.; WALK, E. L.; TANGREA, J. A. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer. **The Journal of urology**. v. 179, n. 2, p. 508-511. 2008.

WOENCKHAUS, J.; FENIC, I. Proliferative inflammatory atrophy of prostate cancer? **Journal of Andrology**, Malden, v. 40, p. 134-137, 2008.

WOZNEY, J. L.; ANTONARAKIS, E. S. Growth factor and signaling pathways and their relevance to prostate cancer therapeutics. **Cancer Metastasis reviews**. 2014. Disponível em: <[http://download.springer.com/static/pdf/926/art%253A10.1007%252Fs10555-013-9475-z.pdf?auth66=1397002877\\_a0279a25b89ea4667fd55073b45df978&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/926/art%253A10.1007%252Fs10555-013-9475-z.pdf?auth66=1397002877_a0279a25b89ea4667fd55073b45df978&ext=.pdf)>. Acesso em: 28 fev. 2014.

WU, H.; HAYASHI, T.; INOUE, M. Immunohistochemical Expression of Mdm2 and p53 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 53, n. 2, p. 65-68. 2006.

WU, Z.; McROBERTS, K. S.; THEODORESCU, D. The Role of PTEN in prostate cancer cell tropism to the bone micro-environment, **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1393-1400, 2007.

WU, C. T.; ALTUWAIJRI, S.; RICKE, W. A.; HUANG, S. P.; YEH, S.; ZHANG, C. et al. Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.104, n. 31, p. 12679–12684, 2007.

YAP, T. A.; SWANTON, C.; DE BONO, J. S. Personalization of prostate cancer prevention and therapy: are clinically qualified biomarkers in the horizon? **The EPMA Journal**.v. 3, n. 1, p. 1-6. 2012.

YU, Y.; ZHANG, Y.; GUAN, W.; HUANG, T.; KANG, J.; SHENG, X.; QI, J. Androgen receptor promotes the oncogenic function of overexpressed Jagged1 in prostate cancer by enhancing cycling B1 expression via Akt phosphorylation. **Molecular Cancer Research**. 2014. Disponível em: <<http://mcr.aacrjournals.org/content/suppl/2014/02/26/1541-7786.MCR-13-0545.DC1.html>>. Acesso em: 28 fev. 2014a.

YU, Q.; LI, Y.; MU, K.; LI, Z.; MENG, Q.; WU, X.; WANG, Y.; LI, L. Amplification of Mdmx and overexpression of MDM2 contribute to mammary carcinogenesis by substituting for p53 mutation. **Diagnostic pathology**, v. 9, n. 71, p.1-8, 2014.

YUAN, X.; CAI, C.; CHEN, S.; YU, Z.; BALK, S. P. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. **Oncogene**. 2013. p. 1-11. Disponível em: <<http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/pdf/onc2013235a.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2014.

YUAN, Z.; WANG, F.; ZHAO, Z.; ZHAO, X.; QIU, J.; NIE, C.; WEI, Y. BIM-Mediated AKT Phosphorylation Is a Key Modulator of Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis in Cisplatin-Sensitive and Resistant Ovarian Cancer Cells. **PLOSone**, .v. 6, n. 5, 2011.

ZENG, L.; KYPRIANOU, N. Apoptotic regulators in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): value in prostate cancer detection and prevention. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**. v. 8, n. 1, p. 7-13. 2005.

ZHA, S.; GAGE, W. R.; SAUVAGEOT, J.; SARIA, E. A.; PUTZI, M. J.; EWING, C. M. et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma, **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, v. 61, p. 8617–8623, 2001.

ZHANG, X.; MORRISSEY, C.; SUN, S.; KETCHANDJI, M.; NELSON, P. S.; TRUE, L. D.; VAKAR-LOPEZ F.; VESSELLA, R. L., PLYMATE, S. R. Androgen Receptor Variants Occur Frequently in Castration Resistant Prostate Cancer Metastases. **PLoS**, v. 6, n. 11, e27970. 2011

ZHOU, X. P.; LOUKOLA, A.; SALOVAARA, R.; NYSTROM-LAHTI, M.; PELTOMAKI, P.; DE LA CHAPELLE, A.; AALTONEN, L. A.; AND ENG, C. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers. **The American Journal Pathology**. v. 161, p. 439–447. 2002.