

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ÓXIDO NÍTRICO, GSTP-1 E P53: QUAL O PAPEL DESSES
BIOMARCADORES E SUAS CORRELAÇÕES COM AS AFECÇÕES
PROSTÁTICAS NO CÃO?**

GIULIANA BRASIL CROCE

Botucatu-SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ÓXIDO NÍTRICO, GSTP-1 E P53: QUAL O PAPEL DESSES
BIOMARCADORES E SUAS CORRELAÇÕES COM AS AFECÇÕES
PROSTÁTICAS NO CÃO?**

GIULIANA BRASIL CROCE

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho”, Campus Botucatu,
para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a Ass.Dr^a Renée Laufer Amorim

Botucatu, SP
Junho, 2010

GIULIANA BRASIL CROCE

**ÓXIDO NÍTRICO, GSTP-1 E P53: QUAL O PAPEL DESSES
BIOMARCADORES E SUAS CORRELAÇÕES COM AS AFECÇÕES
PROSTÁTICAS NO CÃO?**

Banca Examinadora:

Prof.Ass.Dr^a.Renée Laufer Amorim

Prof.Dr.Felipe Augusto Ruiz Sueiro

Prof.Dr^a.Giovana Wingeter Di Santis

Botucatu, 14 de Junho de 2010.

Dedico este trabalho:

À minha família: meus pais Leila e José Mario, à minha irmã Graziella, a vovó Jacy por todo apoio, amor, incentivo e torcida.

À memória do mestre e amigo Roberto Martins Manzan, por fazer saltar aos olhos o amor à Patologia Veterinária.

Agradecimentos

A minha orientadora, Renée Laufer Amorim, pelos ensinamentos patológicos e prostáticos, pela confiança, pelas palavras de otimismo, mas principalmente por incentivar a ver as coisas por novas perspectivas.

Aos amigos e colegas de Pós Graduação: Pedro, Isabelle, Mariana, Márcia, Rodolfo, Érika, Sabrina, Paulo Ricardo por todos os momentos.

Aos residentes da Patologia e ornitopatologia.

Aos funcionários da Patologia Veterinária, Maury Raul e Noel Melo por toda dedicação e ensinamentos.

Aos funcionários da Pós Graduação por toda ajuda prestada.

À Profa Dra Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura pelo auxílio na pesquisa e à Mariana Batista Rodrigues Faleiro, minha companheira prostática, pela troca de conhecimentos, pelo empréstimo do material, pela ajuda no laboratório, pelas conversas.

À família oftálmico: Prof. Quim, Dona Sônia, Prof^a. Valéria, Dani, João, Lupe, Gê, Nívea, Camila, por acolherem a agregada patológica!

Às G's (Guadalupe, Geovana, incluindo a Tíci), muito obrigada por tudo: convivência, ensinamentos, diversão, até pelas brigas, família é isso aí!

Ao Billy, Frida, Fran, Dourado, Maria Rita, Pescocinho, Vadinho pelo amor incondicional e sincero.

À equipe Vetpat pelo apoio e paciência nesse período

Ao meu querido Isaac por todo amor, incentivo, paciência, companheirismo.

À Fapesp pela bolsa e apoio financeiro ao projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
ÓXIDO NÍTRICO, GSTP-1 E P53: QUAL O PAPEL DESSES BIOMARCADORES NAS LESÕES PROSTÁTICAS DO CÃO?	6
Resumo	7
Abstract	8
Introdução	9
Material e Métodos	11
Coleta das amostras	11
Técnica de imunoistoquímica	12
Resultados	13
Discussão	21
Conclusões	24
Referências	25
AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE P53, COX-2 E GSTP-1 EM FOCOS DE ATROFIA INFLAMATÓRIA PROLIFERATIVA E ESPITÉLIO NORMAL ADJACENTE NA PRÓSTATA CANINA.	29
Resumo	30
Abstract	31
Introdução	32

Material e Métodos	33
Seleção das amostras	33
Imunoistoquímica	34
Avaliação quantitativa da imunomarcação de p53	35
Avaliação por escore da imunomarcação de GSTP-1 e COX-2	35
Análise estatística	35
Resultados	35
Discussão	36
Referências	40
Discussão Geral	45
Conclusões Gerais	48
Referências	49
Anexos	56

RESUMO

Lesões pré-neoplásicas da próstata humana foram descritas como neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) e atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e são importantes no diagnóstico precoce do câncer. Nos caninos a PIN foi descrita pela primeira vez por Waters & Bostwick (1997) e nosso grupo de estudo de próstata canina reconheceu a alta frequência de PIA. A relação funcional entre inflamação e câncer não é nova. O estresse oxidativo crônico resulta em peroxidação de lipídeos e geração de outros produtos com potencial de dano ao DNA. Este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão de óxido nítrico (iNOS-2) agente envolvido no desenvolvimento de atipias no epitélio prostático, correlacionando-o com a imunomarcagem dos genes “protetores” como p53 e GSTP-1, para tal, foram coletadas próstatas de cães encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP, Botucatu e da Escola de Veterinária, UFG, Goiânia, GO, tendo sido estas pesadas, medidas, clivadas, processadas, coradas pelo método de Hematoxilina e eosina, submetidas à técnica de imunoistoquímica, para os anticorpos iNOS-2, GSTP-1 e p53. Os cinco grupos de diagnósticos foram estabelecidos sendo: Grupo I: Animais com próstatas normais; Grupo II: Animais com hiperplasia prostática; Grupo III: Animais com PIN; Grupo IV: Animais com PIA, Grupo V: Animais com prostatite; Grupo VI: Animais com adenocarcinoma prostático. Os resultados foram tabulados por grupo diagnóstico e submetidos ao teste estatístico de Tuckey. Os objetivos do presente trabalho consistem em avaliar o papel de óxido nítrico como causador de lesão genotóxica no epitélio prostático atípico, neoplásico, normal e hiperplásico e sua correlação com genes protetores como o p53 e GSTP-1, avaliar e quantificar a imunomarcagem do óxido nítrico nas hiperplasias prostáticas, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e carcinoma prostático; comparar a intensidade de marcação entre os grupos estudados; avaliar e quantificar a imunomarcagem do p53 e GSTP-1 nas hiperplasias prostáticas, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e carcinoma prostático; correlacionar a imunomarcagem de óxido nítrico, p53 e GSTP-1 nas diferentes afecções prostáticas do cão. Os carcinomas prostáticos do cão e a PIA apresentam maior número de amostras (41) com mais de 75% das células positivas para NOS-2, demonstrando a influência do estresse oxidativo no desenvolvimento destas lesões. As próstatas normais de cães, bem como as afecções desta glândula (HPB, PIA, PIN, prostatite e carcinoma)

expressam a proteína GSTP-1, o que confere proteção ao tecido prostático canino a danos oxidativos. A proteína p53 estava presente em todas as amostras estudadas, incluindo o tecido prostático normal, porém as lesões prostáticas apresentaram maior número de amostras com escores mais elevados de marcação (escores três e quatro), presente em 95% dos focos de PIA e carcinoma. Concluiu-se que o aumento de expressão de iNOS-2 nas lesões prostáticas no cão e que a expressão de GSTP-1 pode proteger o tecido prostático canino, o que contribuiria para a baixa frequência de adenocarcinomas prostáticos nesta espécie.

Palavras chave: próstata, cão, óxido nítrico, p53, GSTP-1

ABSTRACT

Preneoplastic lesions of human prostate were described as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and proliferative inflammatory atrophy (PIA) and are very important in early diagnosis of cancer. PIN in dogs was first described by Waters & Bostwick (1997) and our study group of canine prostate recognized the high incidence of PIA. A relação funcional entre inflamação e câncer não é nova. The functional relationship between inflammation and cancer is not new. The chronic oxidative stress results in lipid peroxidation and generation of products with potential for DNA damage. This study aimed to evaluate the expression of nitric oxide (iNOS-2) agent involved in the development of atypical epithelium in the prostate, correlating it with the immunostaining of "protectors" genes as p53 and GSTP-1, for this purpose were collected prostates from dogs sent to the Department of Veterinary Pathology of FMVZ - UNESP, Botucatu and the School of Veterinary Medicine, UFG, Goiânia, GO, they were weighed, measured, cleaved, processed and stained with hematoxylin and eosin, subjected to immunohistochemistry for the iNOS antibody-2, GSTP-1 and p53. Five groups of diagnoses were established: Group I: animals with normal prostates, Group II: Animals prostatic hyperplasia, Group III: Animals with PIN, Group IV: Animals with PIA, Group V: Animals with prostatitis, Group VI: Animals with prostatic adenocarcinoma. The results were tabulated by diagnostic group and subjected to statistical analysis (Tuckey Test). The purpose of this study are to assess role of nitric oxide to cause genotoxic damage in prostatic epithelial atypical neoplastic, normal and hyperplastic and its correlation with protective genes such as p53, and GSTP-1, evaluate and quantify the immunostaining of nitric oxide in prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), proliferative inflammatory atrophy (PIA) and prostatic carcinoma, comparing the intensity of staining between groups, assess and quantify the immunostaining for p53 and GSTP-1 in prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), proliferative inflammatory atrophy (PIA) and prostatic carcinoma; correlate the immunostaining of nitric oxide, p53, and GSTP-1 in different prostatic disease in dogs. Prostatic carcinomas of the dog and PIA have a higher number of samples (41) over 75% of cells positive for NOS-2, demonstrating the influence of oxidative stress in the development of these lesions. The prostates of normal dogs as well as the disorders of this gland (HPB, PIA, PIN, prostatitis and carcinoma)

express GSTP protein-1, which protects canine prostate tissue from oxidative damage. The p53 protein was present in all samples studied, including normal prostate tissue, but the prostatic lesions that had a higher number of samples marked (scores three and four), 95% of foci of PIA and carcinoma. It was concluded that the increased expression of iNOS-2 in prostatic lesions in dogs and that the expression of GSTP-1 can protect the canine prostate tissue, which would contribute to the low frequency of prostate adenocarcinomas in this specie.

Key words: prostate, dog, nitric oxide, p53, GSTP-1

INTRODUÇÃO

O cão deve ser utilizado como modelo para um melhor entendimento da carcinogênese prostática no homem e de possíveis alternativas terapêuticas, pois na sociedade moderna compartilha o mesmo microambiente com o homem. Apesar de casos isolados na literatura de câncer de próstata, outras espécies, como os símios e felinos, homem e cão poderiam ser considerados como as únicas espécies a desenvolver espontaneamente esta lesão. (LE ROY & NORTHROP, 2009).

O termo displasia foi introduzido por McNeal & Bostwick (1986) para designar as anormalidades das células epiteliais dos ductos e ácinos prostáticos, sendo substituído pelo termo Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN), proposto por Bostwick (1992).

Weinstein & Epstein (1993) caracterizam a PIN como glândulas com arquitetura benigna, porém com atipias citológicas. A ausência de um padrão infiltrativo e manutenção de células basais são critérios para este diagnóstico.

Esta lesão foi descrita no cão em 1997 por Waters & Bostwick e seu diagnóstico é feito por analogia com a descrição de alterações celulares dos humanos feita por McNeal & Bostwick (1986). A PIN de alto grau (HGPIN) é a uma das lesões que, no homem, é considerada predisponente ao câncer prostático (BILLIS, 2003; ROSSIGNOL et al., 2004).

Waters e Bostwick (1997a) utilizaram 35 cães sem evidências clínicas de doenças prostáticas para avaliar a incidência de HGPIN em glândulas supostamente normais e determinar se a prevalência da lesão era influenciada pela idade ou por andrógenos testiculares. No grupo de animais com idade entre sete e 17 anos e não castrados observaram-se focos de HGPIN em 55% dos cães. Outros dois grupos avaliados incluindo animais não castrados de um a quatro anos de idade, e animais castrados com sete a 17 anos apresentaram menor incidência da lesão: 8 e 9%, respectivamente. Tais resultados sugerem que HGPIN no cão, assim como no homem, é influenciada pela idade e por hormônios androgênicos testiculares.

Outra lesão que recentemente vem sendo estudada no homem é a atrofia prostática. Esta afecção também é considerada precursora do adenocarcinoma prostático e ocorre associado às inflamações crônicas (DE MARZO et al., 2003).

A atrofia prostática pode representar uma lesão proliferativa e, como esta é acompanhada de inflamação, o termo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) foi introduzido (DE MARZO et al., 2003).

A PIA ocorre adjacente a focos de HGPIN e/ou câncer e apresenta anormalidades genéticas semelhantes (SUGAR, 2006). A PIA pode progredir para HGPIN e, subseqüentemente para carcinoma prostático, ou diretamente para este último. Investigações sobre frequência, distribuição, estágio proliferativo e mudanças genéticas na PIA sugerem a sua relação com o HGPIN e o câncer prostático em humanos (TOMAS et al., 2006).

Recentemente, um grupo de pesquisadores classificou as lesões prostáticas atróficas propondo a subdivisão em dois grupos: atrofia proliferativa com inflamação (PIA) e atrofia proliferativa sem inflamação (PA) (TOMAS et al., 2006).

Rodrigues (2007) descreveu casos de atrofia inflamatória da próstata canina e avaliou seu papel na evolução do câncer prostático. Concluindo que a PIA ocorre em cães com os mesmos padrões morfológicos do que os descritos para o homem, reforçando a necessidade de estudos na espécie canina, a fim de se verificar se esta ocorre antes do PIN e carcinoma, como nos humanos. O que reforça a importância da avaliação do comportamento de lesões anteriormente denominadas displásicas.

A associação com a inflamação crônica sugere que a PIA é resultado de uma proliferação regenerativa das células epiteliais em resposta à injúria causada pelos oxidantes inflamatórios (SUGAR, 2006).

O aparecimento do câncer prostático está mais relacionado às inflamações crônicas do que às agudas (TOMAS et al., 2006).

Insultos crônicos como as infecções, isquemia ou toxinas, resultam em influxo de macrófagos e linfócitos. Estas células inflamatórias podem produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (PALAPATTU et al., 2004; SUGAR, 2006). O estresse oxidativo crônico resulta em peroxidação de lipídeos e geração de outros produtos com potencial de dano ao DNA (DE MARZO et al., 2003; PALAPATTU et al., 2004).

Atualmente, a relação entre inflamação, imunidade inata e câncer tem sido mais amplamente aceita, no entanto, muitos dos mecanismos moleculares e celulares que mediam essa relação não foram completamente elucidados (COUSSENS et al., 2002).

O NO é um radical livre inorgânico sintetizado a partir da L-arginina pela família de isoenzimas denominadas sintases de óxido nítrico (NOS). Diversos efeitos biológicos têm sido atribuídos ao NO, tais como, transmissão neuronal, vasodilatação, relaxamento de músculo liso e mediador de efeitos citotóxicos de macrófagos e neutrófilos (KLOTZ et al., 1998).

Há três isoformas de NOS, denominadas, neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) induzida (iNOS). Neurotransmissão e vasodilatação estão associadas com nNOS, mas a citotoxicidade de macrófagos e imunossupressão induzida nos tumores está associada à iNOS (JECKINS et al., 1995). A expressão de iNOS ocorre através de endotoxinas e/ou citocinas e essa enzima fornece uma liberação sustentada de óxido nítrico (BALTACI et al., 2001).

Produção anormal de NO foi demonstrada em várias condições patológicas, incluindo doenças inflamatórias e auto-imunes, dano tecidual por hipóxia ou anóxia e desordens proliferativas (GRANDINI et al., 1999).

O óxido nítrico é um importante mensageiro intercelular nos mamíferos superiores. O mecanismo de sinalização intercelular é em geral, realizado através de receptores de membrana celular na célula alvo; que são habitualmente transmembranosos tendo contato com citoplasma e desencadeando uma “cascata” de sinais intracelulares que finalizarão em uma mudança na célula (FLORA FILHO et al., 2000). O NO é também considerado uma molécula biologicamente ativa que é conhecida por estar em associação com muitos processos fisiológicos (CRONE et al., 1998).

De acordo com Burnett et al (1995), é um agente citotóxico envolvido em aspectos de proliferação celular e apoptose, responsável pelo relaxamento de vasos sanguíneos, e como neurotransmissor que é ativado nos sistemas nervoso central e periférico (Dawson & Snyder, 1994; Garthwaite & Boulton, 1995).

Dados recentes da expressão de óxido nítrico demonstraram que radicais livres podem tanto iniciar a carcinogênese ou proteger a célula de desenvolver características malignas, dependendo de condições biológicas ou genéticas (PALAPATTU et al., 2004).

Modelos experimentais de inflamação crônica em outros órgãos que não a próstata revela que o óxido nítrico é capaz de causar mudanças estruturais no gene *TP53* e podem afetar sua função (PALAPATTU et al., 2004).

A proteína p-53 é considerada “guardiã” do genoma, pois se um erro ocorre na transcrição do DNA ela interrompe o ciclo para que os mecanismos de reparação atuem. Se o processo falhar, acionam-se eventos apoptóticos e há destruição da célula danificada (SCHMITT, 1999; WANG et al., 2009).

Em células normais a proteína p-53, denominada tipo selvagem, tem meia-vida curta e não se acumula no tecido em níveis detectáveis. Mutações ou deleções no gene *TP53* podem levar à produção alterada da proteína, a qual deixa de desempenhar sua função e acumula-se no tecido podendo ser detectada por imunohistoquímica (SCHMITT, 1999).

Cheng et al. (1999) avaliaram a super-expressão de p-53 nas próstatas de 55 pacientes humanos submetidos a prostatectomia radical, indicada pela recorrência de câncer após terapia radioativa. O exame histopatológico revelou que as neoplasias recorrentes eram biologicamente agressivas e que 28 pacientes apresentavam HGPIN concomitantemente. O acúmulo nuclear de p-53, observado em 91% dos pacientes relacionou-se com o fenótipo agressivo dos tumores e a positividade em 68% dos focos de HGPIN corroborando com a suposição de que esta é uma lesão pré-maligna.

A comparação da expressão de p-53 em áreas de HGPIN, HPB e adenocarcinoma prostático mostra que há diferença significativa entre sua expressão na HPB e no carcinoma, contrariamente, quando se compara HGPIN e adenocarcinoma, a diferença não é estatisticamente significativa, estreitando a relação entre as duas lesões (TAMBOLI et al., 1998).

De acordo com DI SANTIS (2007), no estudo de próstatas caninas a expressão de p53 não foi detectada nos focos de HGPIN, o que indica que este pode ser um mecanismo de defesa efetivo da próstata canina que justifique a baixa incidência de câncer em relação ao homem. Talvez, a viabilidade do gene *TP53* determine a não progressão, ou a progressão mais lenta para o câncer. O mesmo vale para PIA, onde há lesão celular causada por fatores liberados pelas células inflamatórias, mas sem alteração do gene *TP53*, o que potencialmente permite parar a divisão celular e corrigir a fita de DNA ou induzir a apoptose.

O gene *GSTP-1* codifica uma enzima que atua como um detoxificante carcinogênico. *GSTP1* tem sido descrito como um gene “guardião”, pois protege a célula ativamente de dano oxidativo do genoma mediado pelos componentes carcinogênicos (PALAPATTU et al., 2004; WANG et al., 2009).

No epitélio prostático normal humano, a expressão de GSTP1 está geralmente confinada ao compartimento basal. Células benignas luminais ou colunares podem ser induzidas a expressar GSTP1 face ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Epitélio prostático maligno, no entanto, quase invariavelmente não expressa GSTP1 devido à ilha de hipermetilação CpG na região promotora do gene *GSTP1* (PALAPATTU et al., 2004 ; WANG et al., 2009).

OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho consistem em:

OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o papel de óxido nítrico como causador de lesão genotóxica no epitélio prostático atípico, neoplásico, normal e hiperplásico e sua correlação com genes protetores como o p53 e GSTP-1;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar e quantificar a imunomarcção do óxido nítrico nas hiperplasias prostáticas, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e carcinoma prostático;
- Comparar a intensidade de marcação entre os grupos estudados
- Avaliar e quantificar a imunomarcção do p53 e GSTP-1 nas hiperplasias prostáticas, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e carcinoma prostático;
- Correlacionar a imunomarcção de Óxido Nítrico, p53 e GSTP-1 nas diferentes afecções prostáticas do cão.

**Óxido nítrico, GSTP-1 e p53: qual o papel desses biomarcadores nas lesões
prostáticas do cão?**

**Croce, G.B.², Laufer Amorim, R.¹, Rodrigues, M.M.P.², Faleiro, M.B.R.³ de
Moura, V.M.B.D.⁴**

- 1 – Professora Assistente Doutora, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP
- 2 – Pós graduanda, Curso de Medicina Veterinária, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP
- 3 – Pós graduanda, Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFG, Goiânia, GO
- 4– Professora Assistente Doutora, Escola de Veterinária, UFG, Goiânia, GO

Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Comparative Oncology

Apoio Financeiro: Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)

RESUMO

A lesão pré-neoplásica no cão, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), foi descrita em 1997 por Waters & Bostwick e seu diagnóstico é feito por analogia aos critérios estabelecidos para a lesão humana feita por McNeal & Bostwick (1986). Uma outra lesão que vem sendo estudada é a atrofia prostática proliferativa (PIA). Esta afecção também é considerada precursora do adenocarcinoma prostático e ocorre associada a inflamações crônicas. O cão deve ser utilizado como modelo para um melhor entendimento da carcinogênese prostática no homem de e possíveis alternativas terapêuticas, pois na sociedade moderna compartilha o mesmo microambiente com o homem. Confeccionou-se um microarranjo de tecido (TMA) com 146 amostras de lesões prostáticas caninas. Este continha 17,22% de HPB, 32,42% de PIA, 2,65% de prostatite, 8,61% de focos de PIN, 29,14% de carcinomas e 9,34% de próstatas normais. Cortes histológicos seqüenciais foram feitos e utilizados para reação de imunoistoquímica com os anticorpos primários anti p-53, anti-NOS-2 e anti-GSTP.. Avaliou-se de cada core o escore de células marcadas para cada anticorpo utilizado. Os resultados foram tabulados por grupo diagnóstico e submetidos ao teste estatístico de Tuckey. Os carcinomas prostáticos do cão e a PIA apresentam maior número de amostras (41) com mais de 75% das células positivas para NOS-2, demonstrando a influência do estresse oxidativo no desenvolvimento destas lesões. As próstatas normais de cães, bem como as afecções desta glândula (HPB, PIA, PIN, prostatite e carcinoma) expressam a proteína GSTP-1, o que confere proteção ao tecido prostático canino a danos oxidativos. A proteína p53 estava presente em todas as amostras estudadas, incluindo o tecido prostático normal, porém as lesões prostáticas apresentaram maior número de amostras com escores mais elevados de marcação (escores três e quatro), presente em 95% dos focos de PIA e carcinoma. Concluiu-se que o aumento de expressão de NO nas lesões prostáticas no cão e que a expressão de GSTP-1 pode proteger o tecido prostático canino, o que contribuiria para a baixa frequência de adenocarcinomas prostáticos nesta espécie. Já a expressão de p53 foi positiva e uniforme em próstatas normais e com lesões hiperplásicas e displásicas.

Palavras chave: cão, próstata, imunoistoquímica, óxido nítrico, GSTP-1, p53.

ABSTRACT

The pre-neoplastic lesion in the dog, prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), was described in 1997 by Waters & Bostwick and its diagnosis is made by analogy to the criteria established for the human lesion made by McNeal & Bostwick (1986). Another lesion that has been studied is the proliferative prostatic atrophy (PIA). This condition is also considered a precursor of prostate adenocarcinoma and is associated with chronic inflammation. The dog can be used as a model for a better understanding of prostate carcinogenesis in man and possible therapeutic alternatives, because in modern society they share the same microenvironment as men. A tissue microarray (TMA) with 149 samples of canine prostatic lesions, containing 17.22% of BPH, PIA 32.42%, 2.65% prostatitis, 8.61% foci of PIN, 29.14% carcinomas and 9.34% normal prostates. Sequential histological sections were made and used for immunohistochemistry reaction with primary antibodies anti p-53, anti-NOS-2 and anti-GSTP. We evaluated the score for each antibody employed. The results were tabulated by diagnostic group and subjected to statistical analysis (Tuckey Test). Prostatic carcinomas and PIA had higher number of samples (41) with more than 75% of cells positive for NOS-2, demonstrating the influence of oxidative stress in the development of these lesions. The prostates of normal dogs as well as the disorders of this gland (BPH, PIA, PIN, prostatitis and carcinoma) expressed GSTP-1 protein, which gives protection to the canine prostate tissue to oxidative damage. The p53 protein was present in all samples studied, including normal prostate tissue, but the prostatic lesions had a higher number of samples with higher scores (more than 50% of positive cells), in 95% of foci of PIA and carcinoma. We found an increased expression of NO in prostatic lesions of dogs and that the expression of GSTP-1 can protect the canine prostate tissue, which would contribute to the low frequency of prostate adenocarcinoma in this species. The expression of p53 was positive in all lesions as well as the normal prostate

Key words: dog, prostate, immunohistochemistry, nitric oxide, GSTP-1, p53.

INTRODUÇÃO

Com relação às alterações prostáticas, o termo displasia foi introduzido por McNeal & Bostwick (1986) para designar as anormalidades das células epiteliais dos ductos e ácinos prostáticos, sendo substituído pelo termo Neoplasia Intraepitelial Protática (PIN), proposto por Bostwick (1995).

A lesão pré-neoplásica no cão, neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), foi descrita em 1997 por Waters & Bostwick e seu diagnóstico é feito por analogia com a descrição de alterações celulares dos humanos feita por McNeal & Bostwick (1986).

Outra lesão que recentemente vem sendo estudada é a atrofia prostática. Esta afecção também é considerada precursora do adenocarcinoma prostático e ocorre associado a inflamações crônicas (DE MARZO *et al.*, 2003).

A atrofia prostática pode representar uma lesão proliferativa e, como esta é acompanhada de inflamação, o termo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) foi introduzido (DE MARZO *et al.*, 2003).

A PIA ocorre adjacente à focos de neoplasia intra epitelial prostática de alto grau (HGPIN) e/ou câncer e apresenta anormalidades genéticas semelhantes (SUGAR, 2006). A PIA pode progredir para HGPIN e, subseqüentemente para carcinoma prostático ou evoluir diretamente para este último. Investigações sobre frequência, distribuição, estágio proliferativo e mudanças genéticas na PIA sugerem a sua relação com o HGPIN e o câncer prostático em humanos (TOMAS *et al.*, 2006).

Recentemente, um grupo de pesquisadores classificou as lesões prostáticas atróficas propondo a classificação em dois grupos: atrofia proliferativa com inflamação (PIA) e atrofia proliferativa sem inflamação (PA) (TOMAS *et al.*, 2006).

O homem e o cão são provavelmente as únicas espécies a desenvolver espontaneamente o câncer prostático, compartilhando diversas características clínicas e patológicas da doença, embora haja relatos isolados da doença em símios e felinos. (LE ROY & NORTHROP, 2009).

Óxido nítrico (NO) é um radical livre inorgânico sintetizado a partir da L-arginina pela família de isoenzimas denominadas sintases de óxido nítrico (NOS). Diversos efeitos biológicos têm sido atribuídos ao NO, tais como, transmissão neuronal,

vasodilatação, relaxamento de músculo liso e mediador de efeitos citotóxicos de macrófagos e neutrófilos (KLOTZ *et al.*, 1998).

Produção anormal de NO foi demonstrada em várias condições patológicas, incluindo doenças inflamatórias e auto-imunes, dano tecidual por hipóxia ou anóxia e distúrbios proliferativos (GRANDINI *et al.*, 1999).

A proteína p-53 é considerada “guardiã” do genoma, pois se um erro ocorre na transcrição do DNA ela interrompe o ciclo para que os mecanismos de reparação atuem. Se o processo falhar, acionam-se eventos apoptóticos e há destruição da célula danificada (SCHMITT, 1999; WANG *et al.*, 2009).

Em células normais a proteína p-53, denominada tipo selvagem, tem meia-vida curta e não se acumula no tecido em níveis detectáveis. Mutações ou deleções no gene *TP-53* podem levar à produção alterada da proteína, a qual deixa de desempenhar sua função e acumula-se no tecido podendo ser detectada por imunohistoquímica (SCHMITT, 1999).

A comparação da expressão de p-53 em áreas de HGPIN, HPB e adenocarcinoma prostático mostra que há diferença significativa entre sua expressão na HPB e no carcinoma, contrariamente, quando se compara HGPIN e adenocarcinoma, a diferença não é estatisticamente significativa, estreitando a relação entre as duas lesões (TAMBOLI *et al.*, 1998).

O gene *GSTP-1* codifica uma enzima que atua como um detoxificante carcinogênico. *GSTP1* tem sido descrito como um gene “guardião”, pois protege a célula ativamente de dano oxidativo do genoma mediado pelos componentes carcinogênicos (PALAPATTU *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009).

No epitélio prostático normal humano, a expressão de GSTP1 está geralmente confinada ao compartimento basal. Células benignas luminais podem ser induzidas a expressar GSTP1 face ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Epitélio prostático maligno, no entanto, quase invariavelmente não expressa GSTP1 devido à ilha de hipermetilação CpG na região promotora do gene GSTP1 (PALAPATTU *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009).

Há três isoformas de NOS, denominadas, neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) induzida (iNOS). Neurotransmissão e vasodilatação estão associadas com nNOS, mas a citotoxicidade de macrófagos e imunossupressão induzida nos tumores está associada à iNOS (JECKINS *et al.*, 1995). A expressão de iNOS ocorre através de endotoxinas e/ou

citocinas e essa enzima fornece uma liberação sustentada de óxido nítrico (BALTACI *et al.*, 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão protéica de iNOS, GSTP1 e p53 pela técnica de imunoistoquímica em tecido prostático canino normal e com diferentes afecções, dentre elas HPB, PIN, PIA e carcinoma.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram utilizadas as próstatas de 149 cães provenientes Centro de Controle de Zoonoses das Prefeituras Municipais de Botucatu/SP e Bauru/SP e na Escola de Medicina Veterinária da Universidade de Goiás, Goiânia. As glândulas foram retiradas e após todas as aferições (comprimento, largura, altura, peso), cortes de 0,5 cm de espessura com navalhas para micrótomo, descartáveis foram feitos e colocados em cassetes plásticos.

Em seguida foram identificados e anotados os dados como idade (animal jovem, adulto e idoso), raça, presença de testículos e possíveis alterações macroscópicas na próstata.

Os cassetes plásticos permaneceram no formol por 24 horas e, em seguida, foram colocados em álcool 70%. Logo após foram processados para inclusão em parafina. Foram confeccionados cortes de três µm em micrótomo automático, colocados em estufa para desparafinizar e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. As lesões foram classificadas em PIA de acordo De Marzo *et al.* (1999), PIN segundo Waters e Bostwick (1997) e carcinoma de acordo com Foster e Ladds (1997).

De cada lâmina histológica confeccionada, a área das respectivas lesões foi demarcada e submetida à técnica de microarranjo de tecido (TMA), realizada no Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. O anexo dois identifica todos os casos contidos na lâmina de TMA.

Das áreas previamente definidas nos respectivos blocos de parafina, foi feita uma biopsia (*core*) com o uso do equipamento Tissue Microarrayer (Beencher Instruments[®], Silver Spring, USA). Os *cores* tinham o diâmetro de 1,0mm, sendo introduzidos em um bloco de parafina virgem, com a distância de 0,2mm entre eles (Figura 1). O bloco receptor foi seccionado em micrótomo, sendo os cortes transferidos para lâminas adesivas (Instrumedics Inc[®], Hackensack, NJ). A primeira delas foi corada

por HE e os diagnósticos revistos (Figura 1). As demais permaneceram em freezer - 20°C até a realização da técnica de imunoistoquímica.

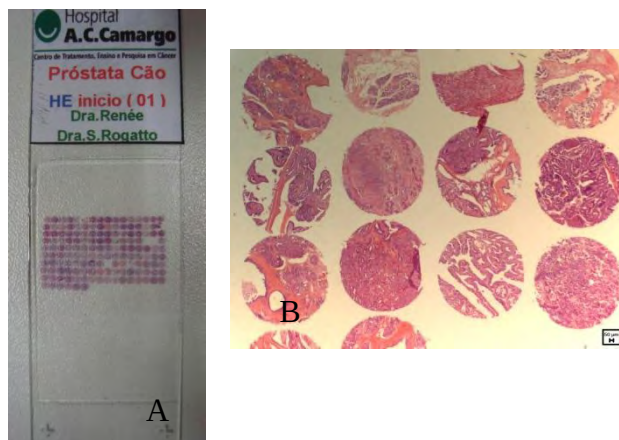


Figura 1– Lâmina de microarranjo de tecido (TMA) de próstata de cão (A). Aspecto da lâmina e (B) cores corados por HE.

Técnica de imunoistoquímica

Optou-se por adquirir anticorpos policlonais óxido nítrico e após padronizações apresentadas no anexo 3 a técnica foi realizada nas lâminas de TMA.

Seguiu-se o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu para os anticorpos primários óxido nítrico (iNOS-2 (N20), Ig Rabbit Santa Cruz), GSTP-1 (anti-GSTP-1 RB-050-A Glutathione S-Transferase, pi-Ab-1, Labvision), p53 (NCL-p53-CM1, Novocastra).

A desparafinização foi realizada com dois banhos em xilol de 30 e 20 minutos cada em temperatura ambiente e o processo de desidratação foi realizado com passagens em álcool absoluto (três vezes de três minutos), álcool 95° e álcool 85°.

Procedeu-se a recuperação antigênica com solução de citrato 10mM, pH 6,0 pré-aquecida em câmara de pressão Pascal®. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando 92 ml de álcool metílico e 8 ml de peróxido de hidrogênio PA durante 20 minutos. Em seguida o material foi mantido por 1 hora em solução de leite Molico® diluída a 3% em água deionizada.

Procedeu-se a incubação com o anticorpo primário na diluição de 1:100 para os anticorpos NOS-2 e GSTP-1 e 1:500 para p-53, em diluidor de anticorpos (Dako S3022) em câmara úmida por 18 horas a 4°C para NOS-2 e GSTP-1 e por 2 horas para p-53 a 27°C. O complexo secundário utilizado foi o Advance (Dako K4068), exceto para

GSTP-1 onde usamos o kit VECTASTAIN ABC[®] (Vector Labs) seguindo as recomendações do fabricante. As lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS pH 7,4 entre as etapas.

Para revelação da reação foi empregada solução pronta para uso de DAB (Dako K34466) por cinco minutos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas.

Como controle positivo das reações, utilizou-se para o anticorpo primário p53 um carcinoma de células escamosas de cão, sabidamente positivo para este anticorpo; para o GSTP-1, fígado canino e para o NOS-2, intestino delgado de cão, ambos seguindo as recomendações do fabricante dos anticorpos primários. Os controles negativos foram feitos substituindo-se o anticorpo primário por imunoglobulina de coelho, nas mesmas condições das reações com anticorpo primário.

Para a avaliação das amostras utilizou-se escores em relação à porcentagem de células marcadas para os anticorpos NOS-2, GSTP-1 e p-53, sendo 0: sem marcação; 1: até 25% de células marcadas; 2: 25 a 50% de células marcadas; 3: 50 a 75% e 4: 75 a 100% (adaptado de Wang et al., 2009). A leitura foi feita no foco da lesão, em objetiva de 40 vezes.

RESULTADOS

As lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram avaliadas por três patologistas (RLA, GBC, MMPR) e classificadas de acordo com metodologia descrita. O anexo três apresenta o resultado das leituras e a figura 2 ilustra a morfologia das lesões estudadas.

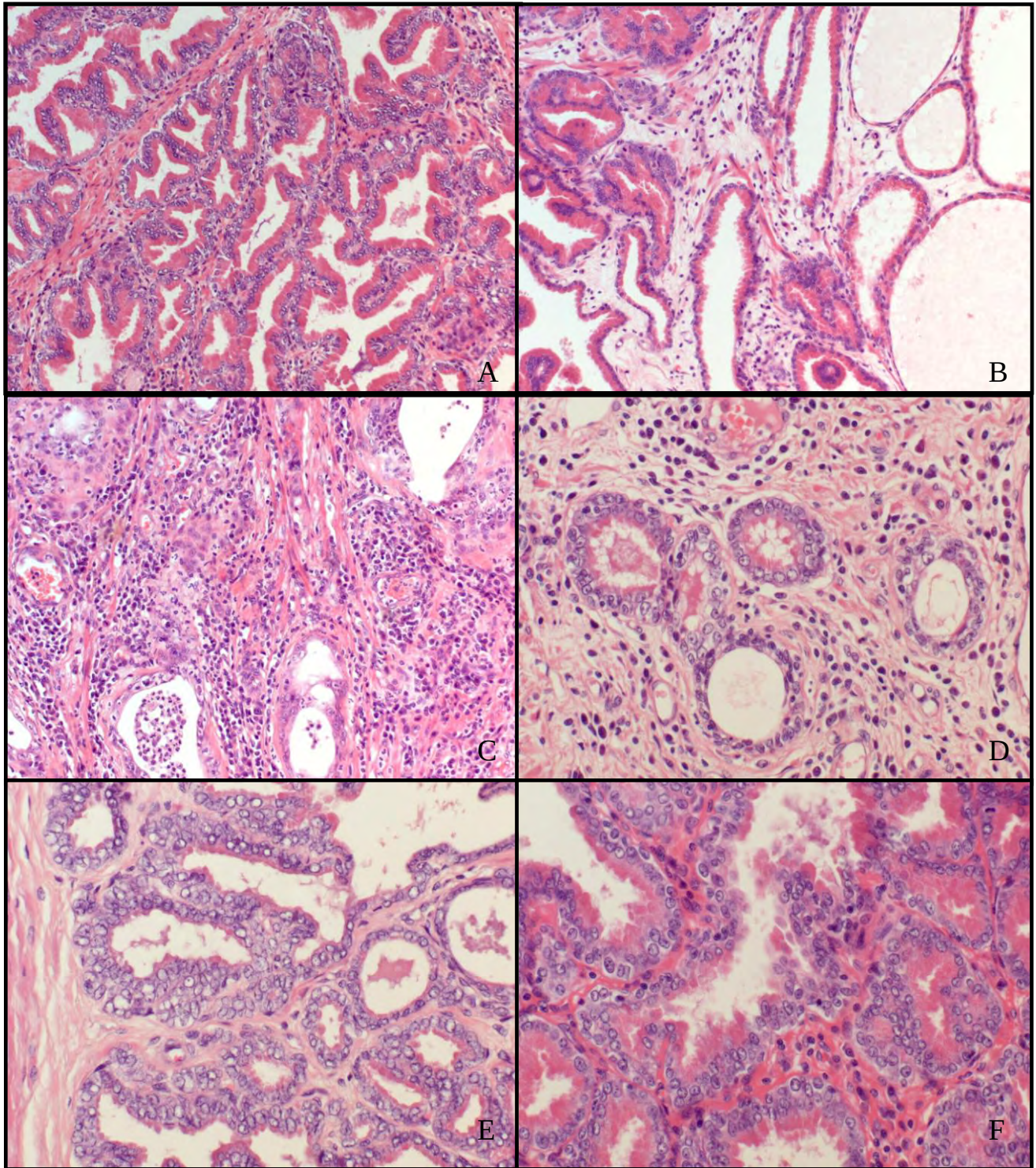


Figura 2- Próstata de cão (A) Próstata normal. Padrão epitelial e estromal característico. HE, 20x. (B) Hiperplasia prostática benigna. Proliferação organizada de células epiteliais com formações císticas. HE, 20x. (C) Prostatite. Intenso infiltrado inflamatório polimorfo e mononuclear difuso estromal e intracinar. HE, 20x. (D) Atrofia inflamatória proliferativa. Infiltrado inflamatório mononuclear estromal e foco de atipia epitelial com atrofia. HE, 40x. (E) Neoplasia intra-epitelial prostática. Foco de células epiteliais que apresentam empilhamento e atipia. HE, 40x. (F) Carcinoma prostático. Células epiteliais desorganizadas que apresentam atipia nuclear e nucléolos evidentes. HE, 40x.

Após o estabelecimento do diagnóstico de cada amostra, escolheu-se a área mais representativa da mesma, que foi marcada com uma caneta permanente para a confecção do bloco receptor do microarranjo de tecido (TMA). Este continha 17,22% de HPB, 32,42% de PIA, 2,65% de prostatite, 8,61% de focos de PIN, 29,14% de carcinomas e 9,34% de próstatas normais.

As tabelas apresentadas nos anexos 4, 5, 6, 7, 8 e 9 correspondem à leitura das lâminas na técnica de imunoistoquímica, para os anticorpos NOS-2, GSTP-1 e p53.

A figura dois corresponde à imunomarcção obtida para os anticorpos estudados. Observamos, à esquerda a marcação nos *cores* e à direita em aumento maior.

O resultado da avaliação está exposto nas figuras três, quatro, cinco e seis e tabelas 1, 2 e 3.

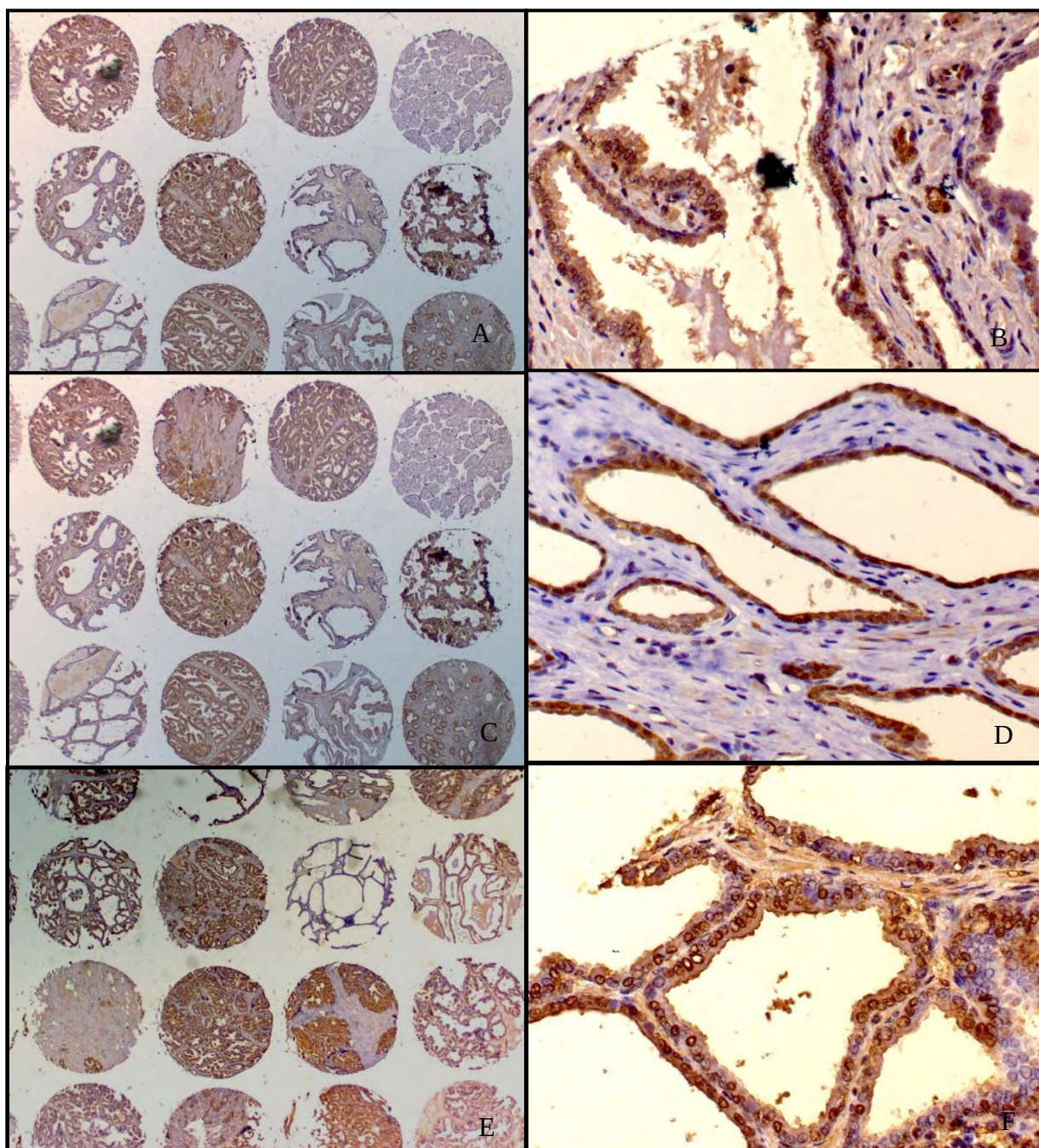


Figura 3- Próstata de cão (A) TMA imunomarcção positiva para NOS-2 objetiva de 5x. (B) Imunomarcção positiva para NOS-2 objetiva de 10x. (C) Imunomarcção positiva para GSTP-1 objetiva de 5x. (D) Imunomarcção positiva para GSTP-1 objetiva de 10x. (E) Imunomarcção positiva para p53 objetiva de 5x. (F) Imunomarcção positiva para p53, objetiva de 10x.

Tabela 1: Percentual de amostras positivas para o anticorpo primário NOS-2, de acordo com o diagnóstico histopatológico da próstata e escore de % de células marcadas para cada lesão.

Diagnóstico/escore	Normal	HPB	PIA	Prostatite	PIN	Carcinoma
Escore 0						
Escore 1	16,66%	4%				
Escore 2	16,66%	12%	4,88%		45,16%	7,89%
Escore 3	66,66%	28%	24,39%		7,69%	36,84%
Escore 4		56%	70,73%	100%	45,16%	55,26%

Percentual de marcação: zero: não marcado; um: até 25% de células marcadas por campo; dois: de 26 a 50%; três: de 51 a 75% e quatro: mais de 76% de células marcadas por campo. (adaptado de Wang et al., 2009).

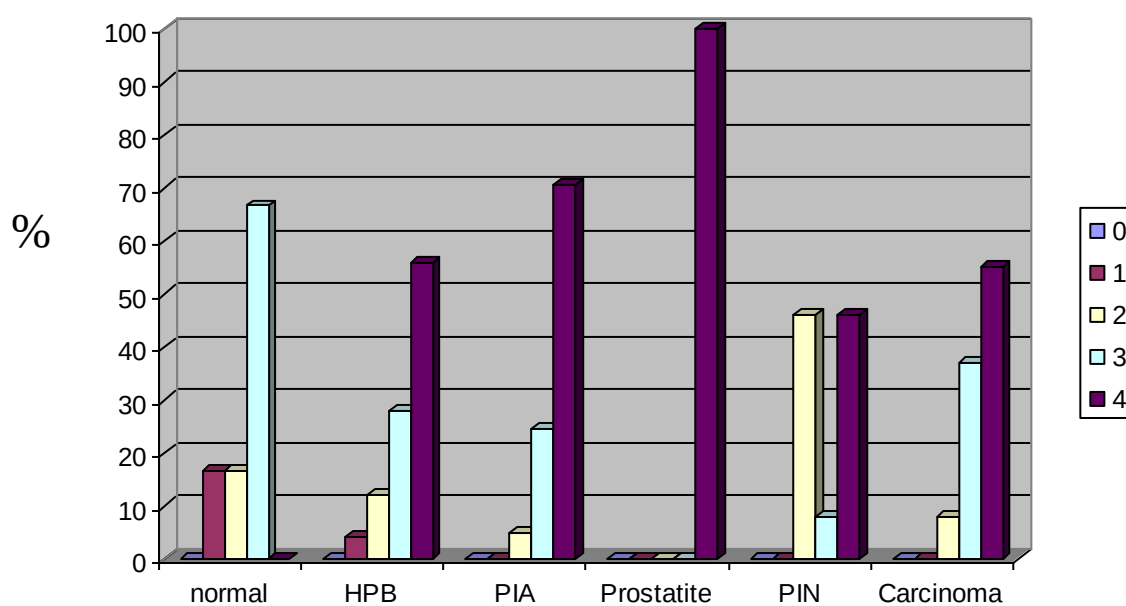


Figura 4 – Percentual de amostras positivas para NOS-2, distribuídas nos escores avaliados, de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Todas as alterações prostáticas tiveram mais de 45% das amostras classificadas no escore quatro, já as normais, não passaram de três. O teste estatístico de Tuckey, com significância de 95%, revelou que o percentual de amostras de lesões prostáticas caninas com escore 4, era significativamente diferente dos escores 1 ($p<0,01$) e 2 ($p<0,05$). As amostras de PIA e carcinoma obtiveram o maior percentual de amostras com escores mais altos (escores 3 e 4) do que as demais lesões prostáticas estudadas e o tecido prostático normal. Já a prostatite apresentou 100% das amostras com maior imunomarcção para NOS-2 (100% escore, 4).

Tabela 2: Percentual de amostras positivas para o anticorpo primário GSTP-1, de acordo com o diagnostico histopatológico da próstata e escore de % de células marcadas para cada lesão.

Diagnóstico/escore	Normal	HPB	PIA	Prostatite	PIN	Carcinoma
Escore 0			2,27%			
Escore 1	15,38%		9,10%	25%		2,63%
Escore 2		8%	9,10%			10,53%
Escore 3		16%			7,69%	13,16%
Escore 4	86,62%	76%	79,54%	75%	92,31%	73,68%

Percentual de marcação: zero: não marcado; um: até 25% de células marcadas por campo; dois: de 26 a 50%; três: de 51 a 75% e quatro: mais de 76% de células marcadas por campo. (adaptado de Wang et al., 2009).

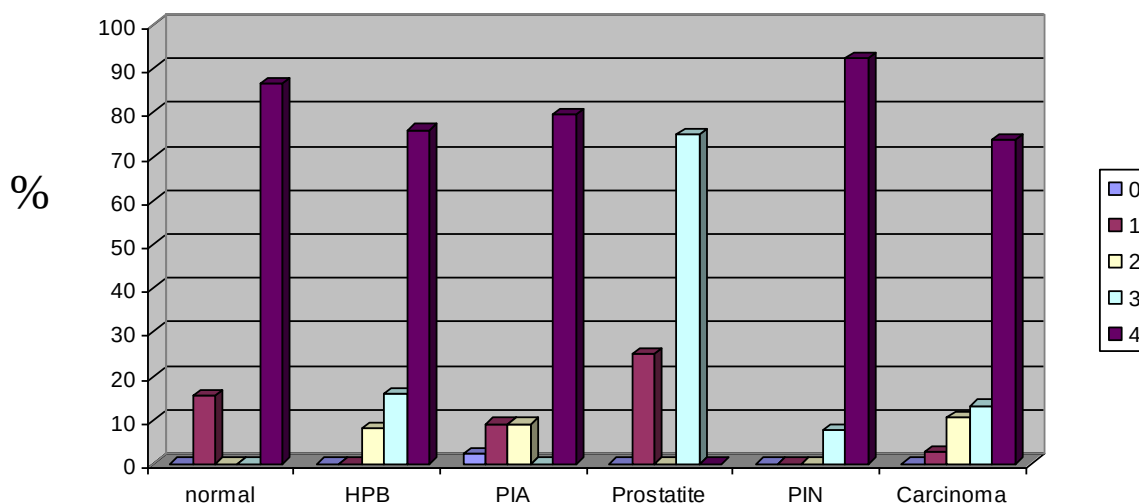


Figura 5 – Percentual de amostras positivas para GSTP-1, distribuídas nos escores avaliados, de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Exceto a prostatite, todas as lesões e a próstata normal do cão, apresentaram maior percentual de amostras com escore 4 Para GSTP-1 (76 a 100% de células marcadas). Em uma amostra de PIA não houve expressão desta proteína (escore zero).

Considerando-se escores acima de 50% de células marcadas (escores 3 e 4), todas as lesões estudadas tinham mais de 75% das amostras nestes intervalos de imunomarcacão, inclusive o tecido prostático normal.

O número de amostras escore 4 foi significativamente diferente daquelas escore zero ($p < 0,01$), 1 ($p < 0,001$), 2 ($p < 0,001$) e 3 ($p < 0,01$), pelo teste de Tuckey observado em todas as lesões.

Tabela 3: Percentual de células marcadas pelo anticorpo primário anti-p53 (clone CM-1) de acordo com diagnóstico histopatológico das lesões prostáticas estudadas.

Diagnóstico/escore	Normal	HPB	PIA	Prostatite	PIN	Carcinoma
Escore 0						
Escore 1	7,69%	3,70%			14,28%	2,63%
Escore 2	7,69%	7,40%	2,13%	25%		2,63%
Escore 3	23,08%	3,70%	6,38%	75%	42,86%	18,42%
Escore 4	69,23%	85,18%	91,49%		42,86%	76,31%

Percentual de marcação: zero: não marcado; um: até 25% de células marcadas por campo; dois: de 26 a 50%; três: de 51 a 75% e quatro: mais de 76% de células marcadas por campo. (adaptado de Wang et al., 2009).

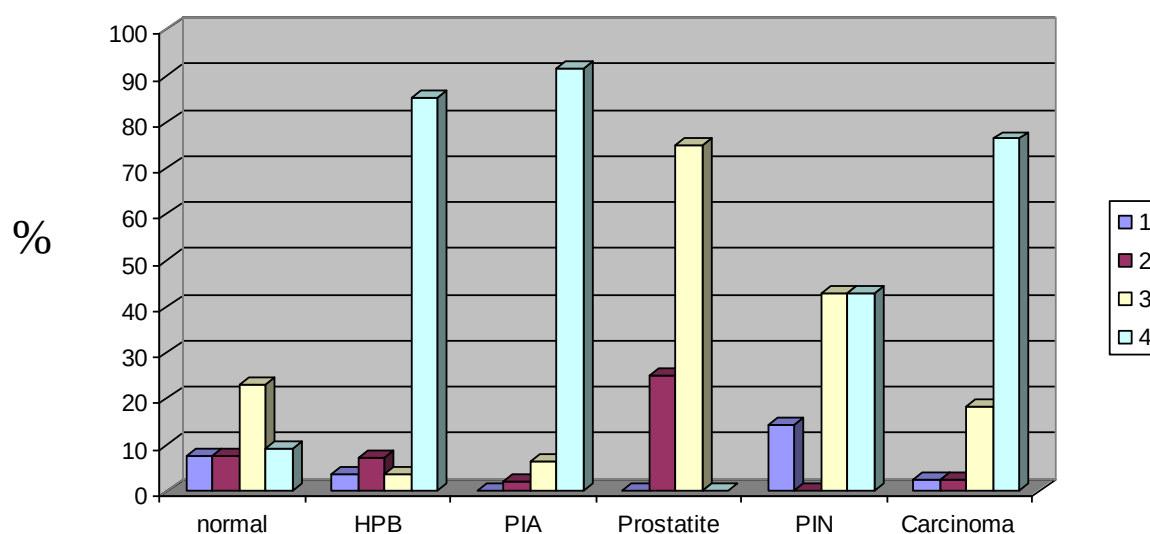


Figura 6 – Percentual de amostras positivas para p53, distribuídas nos escores avaliados, de acordo com o diagnóstico histopatológico.

Todas as amostras avaliadas exibiram marcação para o anticorpo primário anti-p53. Os maiores números de amostras positivas no escore 4 ocorreram nos diagnósticos de HPB, PIA e carcinoma.

Quando avaliamos a imunomarcção para esta proteína, superior a 50% (escores 3 e 4), observamos que os focos de PIA e carcinomas tiveram mais de 95% das amostras nestes valores.

O percentual de amostras com escore 4, independentemente da lesão histopatológica, foi estatisticamente diferente dos escores 1 e 2 ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A próstata é sítio de diversas afecções, dentre elas a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), considerada precursora do câncer prostático (ROSSIGNOL *et al.*, 2004).

Waters & Bostwick (1997) descrevem um alto índice desta lesão em cães, entretanto nosso trabalho revelou baixa incidência (8,61%) concordando com os dados de Rossignol *et al.* (2004) e Argyle (2009).

Assim como descrito na literatura, registramos focos de PIN adjacentes aos carcinomas prostáticos, anuindo com a teoria de que a PIN seja uma lesão pré-neoplásica (Waters & Bostwick, 1997) e, como nos humanos, onde há focos de HGPN, há carcinoma.

Na próstata normal do cão e nas lesões avaliadas, observou-se expressão protéica de NOS-2, sendo que a PIA e os carcinomas apresentaram maior número de amostras com mais de 75% de células positivas (escore 4) do que as demais amostras. O papel do óxido nítrico na carcinogênese é controverso.

A formação de óxido nítrico através de iNOS causa efeitos citotóxicos e citostáticos nas células tumorais e, ainda pode atuar como inibidora do crescimento tumoral. No entanto, óxido nítrico, pode promover angiogênese em tumores e ainda estimular seu crescimento (Baltaci *et al.*, 2001). A via do óxido nítrico nessa ação dupla ocorre fora do núcleo e há muitos achados conflitantes no papel do óxido nítrico no crescimento tumoral (Uotila *et al.*, 2001).

Estudos de Klotz *et al.* (1998) e Uotila *et al.* (2001) indicaram que a expressão de NOS-2 é estimulada no adenocarcinoma prostático humano e que essa proteína e também expressa na PIN, como observado em nosso estudo, na próstata canina. Esses achados são de interesse especial, pois o óxido nítrico desempenha papel importante na angiogênese e progressão tumoral e pode também mediar efeitos sobre o fator de crescimento do endotélio vascular.

Em próstatas humanas a atividade do iNOS foi verificada nos estudos de Klotz *et al.* (1998) e Grandini *et al.* (1999) os quais mostraram resultados conflitantes quanto à expressão imunoistoquímica em amostras de HPB. Klotz *et al.* (1998) relataram que o carcinoma prostático teve uma alta expressão, enquanto o tecido benigno não, e sugerem que a expressão de iNOS poderia ser utilizada como marcador específico para adenocarcinoma prostático. Em contrapartida, Grandini *et al.* (1999) mostraram que iNOS era positiva em amostras de HPB e não detectaram iNOS em três pacientes com próstatas normais e indicaram que iNOS não poderia ser utilizado como marcador específico para adenocarcinoma prostático.

Corroborando com os resultados de Baltaci *et al.* (2001), que concluíram que todas as condições patológicas que acometem a glândula e poucas amostras de HPB expressaram iNOS, sendo que a intensidade de marcação foi maior nos casos de HGPIN, PIN e carcinoma, reforçando o papel do iNOS na carcinogênese prostática, as afecções prostáticas do cão expressam NOS-2, tendo o percentual de células marcadas mais intenso nos carcinomas e menos na HPB e PIN. Todas as amostras prostáticas avaliadas apresentaram maior escore de imunomarcação (mais de 75% de todas as amostras foram escore 3 e 4 ->50% de células marcadas) para GSTP-1.

A GSTP-1 é induzida na resposta oxidativa e deve estar aumentada nos focos de PIA, pelo infiltrado inflamatório presente (PARSONS *et al.*, 2001). Como o número de amostras positivas para NOS-2 também foi alto, inferimos que o GSTP-1 esteja aumentado em resposta ao estresse oxidativo.

Nas áreas de PIA, a alta imunomarcação de GSTP-1 é esperada, uma vez que sugere a existência de estresse oxidativo na área, devido ao microambiente inflamatório. Este resultado é concordante com dados da literatura humana (WANG *et al.*, 2009).

No entanto, Nakayama *et al.* (2003), encontraram diminuição de GSTP-1 nas áreas de PIA e propuseram que a ausência da expressão de GSTP-1 pode ser consequência da hipermetilação das ilhas CpG. Os resultados obtidos mostraram que as mudanças na hipermetilação ocorrem em algumas lesões de PIA e sugerem evidências moleculares de que estas iniciaram a progressão para HGPIN e/ou adenocarcinoma prostático.

Em estudos prévios de nosso grupo (De Moura, 2004, Rodrigues, 2007 e Di Santis, 2007) e na literatura mais recente consultada sobre afecções prostáticas no cão, é descrita uma baixa frequência de focos de HGPIN e carcinoma (Rossignol *et al.*, 2004, LeRoy & Northrup, 2009, Argyle, 2009). Várias hipóteses podem ser levantadas a este

respeito, e uma delas seria a alta reatividade do epitélio prostático nos focos de PIA ao GSTP-1, que atuaria como protetor aos danos de espécies reativas do oxigênio, evitando lesões no material genético (iniciação celular) (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Wang *et al.* (2009) comentam sobre o acúmulo de p53 e expressão aumentada de GSTP-1, que poderia induzir a apoptose dessas células, por outros mecanismos, que não a via do p53, como por exemplo o dano a mitocôndria por radicais livres, com a subsequente liberação de citocromo c, que ativará a apoptose pela via das caspases. Já aquelas células que acumulam p53, mas não expressam GSTP-1 podem ser alvo de alterações genéticas e transformação neoplásica.

Estes resultados nos fazem pensar, que o estudo de um biomarcador ou um grupo pequeno deles, pode não explicar ou elucidar a progressão tumoral, em diferentes modelos. Devemos levar em consideração as vias envolvidas e o conhecimento de que no organismo vias alternativas são responsáveis por resultados biológicos semelhantes.

O percentual de positividade para a proteína p53 foi elevado em todas as áreas. Porém, quando avaliamos a imunomarcagem para esta proteína superior a 50% (escores 3 e 4), observamos que os focos de PIA e carcinomas tiveram mais de 95% das amostras nestes valores. O acúmulo da proteína mutante é fator de prognóstico ruim, pois a parada do ciclo celular para eventuais correções da fita de DNA e o estímulo à apoptose estarão ausentes nesta célula, por mutação do gene *TP53*, considerado o “guardião do genoma” (Wang *et al.*, 2009).

Em humanos, a expressão de p53 está relacionada a índices proliferativos mais elevados no câncer prostático e na HGPIN e a um fenótipo mais agressivo no câncer (Cheng *et al.*, 1999) e sua mutação já foi detectada em focos de PIA (TSUJIMOTO *et al.*, 2002).

Stricker *et al.* (1996) relatam que adenocarcinomas prostáticos em humanos, positivos para p53 têm maior probabilidade de progressão da doença, o que corrobora com o potencial maligno dos focos de PIA, que em nosso estudo foram reativos para esta proteína.

Por outro lado, a avaliação imunoistoquímica da proteína p53 não é uma ferramenta muito precisa para correlacionar sua expressão em lesões prostáticas. Isso se deve por dois fatores: meia vida curta da proteína o que torna difícil sua identificação no tecido e a uma possível reação cruzada entre as formas selvagem e mutante como demonstrado por Wang *et al.*, 2009.

A evolução dos focos de PIA para carcinoma, ou mesmo do epitélio adjacente normal (porém com acúmulo de p53, NOS-2 e GSTP-1) associado à informação da baixa frequência de câncer de próstata na espécie canina (Rossignol *et al.*, 2004, LeRoy & Northrup, 2009, Argyle, 2009) nos faz questionar se o aumento de expressão de GSTP-1 é um fator protetor e indutor da apoptose de células potencialmente malignas e se a superexpressão de NOS-2 e acúmulo de p53 seriam indutores de proliferação celular, angiogênese, que corroboraria para o surgimento de câncer.

CONCLUSÕES:

Os carcinomas prostáticos do cão e a PIA apresentam maior número de amostras com mais de 75% das células positivas para iNOS-2, demonstrando o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento dessas lesões.

As próstatas normais de cães, bem como as afecções desta glândula (HPB, PIA, PIN, prostatite e carcinoma) expressam a proteína GSTP-1, o que confere proteção ao tecido prostático canino a danos oxidativos.

A proteína p53 está presente em todas as amostras estudadas, incluindo o tecido prostático normal, porém as lesões prostáticas apresentaram maior número de amostras com escores mais elevados de marcação.

REFERÊNCIAS

ARGYLE, D (2009). Prostate cancer in dog and men: a unique opportunity to study the disease. *The Veterinary Journal*. **180**, p. 137-138.

BALTACI *et al* (2001). Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *BJU International*. **88**, p.100-103.

BOSTWICK, D.G (1995). High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the most likely precursor of prostate cancer. *Cancer*, **75**, p. 1823-36.

CHENG, L (1999). p53 overexpression is associated with increased cell proliferation in patients with locally recurrent prostate carcinoma after radiation therapy. *Cancer*, **85**, p. 1293-99.

DE MARZO, AM.; MARCHI, VL; EPSTEIN, JI; NELSON, WG (1999). Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for carcinogenesis. *Am J Pat*, **155**, n. 6, p.1985-1992.

DE MARZO *et al* (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. **62**, p.55-62.

DE MOURA, V.M.B.D (2004). Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos. Botucatu. 144 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DI SANTIS,G.W (2007). Padrão histopatológico, perfil imunoistoquímico e potencial pré-maligno das lesões displásicas da próstata canina. Botucatu. 132p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

GRANDINI, R; REALACCI, M; GINEPRI, A.; NASO, G.; SANTANGELO, C.; *et al* (1999). Nitric Oxide Synthases In Normal And Benign Hyperplastic Human Prostate: Immunohistochemistry And Molecular Biology. *J. Pathol.* **189**, p. 224–229.

JENKINS, D.C., *et al* (1995). Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci*, **92**, p. 4392-4396.

KLOTZ, T.; BLOCH, W.; VOLBERG, C.; ENGELMAN, U.; Addicks, K (1998). Selective Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Prostate Carcinoma. *Cancer*. **82**, n.10, p.1897-1903,.

LE ROY, B. E.; NORTHRUP, N (2009). Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*, **10**.

MADEWELL, B. R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; DEVERE WHITE, R.W (2004). Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Is the Comparative Model Relevant? *The Prostate*. **58**, p.314-317.

McNEAL, J.E.; BOSTWICK, D.G (1986). Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. *Hum. Pathol.*, **17**, p.64-71.

NAKAYAMA, M; BENNETT, C.J; HICKS, J.L; EPSTEIN, J.I; PLATZ, E.A; *et al* (2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: A detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* **163**(3), p.923–933.

OLSON, P.N. *et al* (1987). Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. *Comp. Cont. Ed.*, **9**, p.613-23.

PALAPATTU, G.S. *et al* (2004). Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*. **26**, n.7, p.1170-1181.

PARSONS, J.K; NELSON, C.P.; GAGE, W.R.; KENSLER, T.W.; DE MARZO, A.M (2001). GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. *Prostate*, **49**, p. 30-37.

RODRIGUES, M.M.P. Imunomarcção de COX-2 e TGF- β nas lesões proliferativas da próstata do cão. Botucatu, 2007, 52p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

RODRIGUES, M. M. P. ; DI SANTIS, G. W.; DE MOURA, V. M. B.; BANDARRA, E. P.; LAUFER-AMORIM, R (2010). Neoplasia Intra-epitelial prostática: aspectos morfológicos e moleculares. *Veterinária e Zootecnia (UNESP)*, **17**, p. 19-25.

ROSSIGNOL, A.; VILLERS, A.; MOLINIÉ, V.; MAZEROLLES, C.; PRADÈRE, M. *et al* (2004). Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien. Validité du modèle animal pour l'étude des lésions précancéreuses. *Revue Méd. Vét.*, **155**, p.21-26.

SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISON, A.; CROCKER, J (1999). The effect of a series of fixative on the AgNOR technique. *J Pathol*, **155**, p. 109-12.

STRICKER, H.J.; JAY, J.K.; LINDEN, M.D.; TAMBOLI, P.; AMIN, M.B (1996). Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology*, **47**, p. 366-69.

SUGAR, LM (2006). Inflammation and prostate cancer. *Can J Urol*, **13**, n.1, p.46-47,.

SWINNEY, G.R (1998). Prostatic neoplasia in five dogs. *Aust. Vet. J.*, **76**, n.10, p.669-674 .

TAMBOLI, P. *et al* (1998). Immunohistochemical expressions of retinoblastoma and p-53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. *Mod Pathol*, **11**, n. 3, p. 247-252.

TESKE, E.; NAAN, E.C.; VAN DIJK, E, M.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J.A (2002). Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. *Mol Cell Endocrinol.* **197**, p. 251-255.

TOMAS, D.; KRUSLIN, B.; ROGATSCH, H.; SCHAFER, G.; BELICZA, M.; MIKUZ, G (2006). Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. *European Urology*, p.1425-1431.

TSUJIMOTO, Y.; TAKAYAMA, H.; NONOMURA,N; OKUYAMA, A; AOZASA, K (2002). Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: Histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. *Prostate*, **52**, p. 279-287.

UOTILA, P.; VALVE, E.; MARTIKAINEN, P.; NEVALAINEN, M.; NURMI, N; *et al* (2001). Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. **Urol Research.** V.29, p.25-28.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J-E (2009). Increased p53 immunoreactivity in proliferative inflammatory atrophy of prostate is related to focal acute inflammation. *APMIS*, **117**. p.185-195.

WATERS, D.J.; SAKR, W.A.; HAYDEN, D.W.; MAX LANG, C.; McKINNEY, L; *et al* (1997). Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. *Prostate*, **30**, p. 92-7.

WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G (1997a). The canine is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. *Antic. Res.*, **17**, p. 1467-70.

WEINSTEIN, M.H.; EPSTEIN, J (1993). Significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy. *Human Pathology*, **24**, n.6, 624- 629.

**Avaliação imunoistoquímica de p53, COX-2 e GSTP-1 em focos de Atrofia
Inflamatória Proliferativa e epitélio normal adjacente na próstata canina
Croce, G.B.², Laufer Amorim, R.¹, Rodrigues, M.M.P.², Faleiro, M.B.R.³ de
Moura, V.M.B.D.⁴**

- 1 – Professora Assistente Doutora, Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP
- 2 – Pós graduanda, Curso de Medicina Veterinária, FMVZ, Unesp, Botucatu, SP
- 3 – Pós graduanda, Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFG, Goiânia, GO
- 4– Professora Assistente Doutora, Escola de Veterinária, UFG, Goiânia, GO

Trabalho a ser enviado para a revista APMIS

Apoio Financeiro: Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp)

RESUMO

O homem e o cão dividem o mesmo ambiente e desenvolvem, espontaneamente, com o avançar da idade lesões prostáticas, tais como hiperplasia prostática benigna e carcinoma prostático. Por isso, o cão deve ser utilizado como modelo para um melhor entendimento da carcinogênese prostática no homem de possíveis alternativas terapêuticas. O estudo de lesões pré-neoplásicas é importante para se conhecer a evolução do processo carcinogênico visando diagnóstico precoce dos tumores. No homem, a neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HGPIN) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) são consideradas lesões precursoras do carcinoma prostático. No cão, há descrições de HGPIN e carcinoma. Em nossa experiência, a lesão displásica de maior incidência no cão é a PIA. Este trabalho teve por objetivo avaliar a imunomarcagem de p53, COX-2 e GSTP-1 em focos de atrofia inflamatória proliferativa (PIA) de próstatas caninas e em ácinos morfológicamente normais, adjacente aos focos de PIA, a fim de verificar o potencial pré-maligno deste microambiente. Selecionou-se 11 próstatas caninas com áreas de PIA, baseados na descrição de De Marzo et al. (2006). Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti- p53 (NCL-p53-CM1); anti-GSTP-1(RB-050-A Glutathione S-Transferase, pi-Ab-1); anti-COX-2 (Cyclooxygenase-2 clone: CX-294). Utilizou-se o teste t não paramétrico para e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. Os anticorpos GSTP-1, COX-2 e p53 mostraram expressão rica e heterogênea tanto nas células epiteliais normais como nos focos PIA. Não houve diferença significativa entre as médias de imunomarcagem de p53 nos focos de PIA e epitélio normal adjacente. A evolução dos focos de PIA para carcinoma, ou mesmo do epitélio adjacente normal (porém com acúmulo de p53, COX-2 e GSTP-1) associado a informação da baixa frequência de câncer de próstata na espécie canina nos faz crer que o aumento de expressão de GSTP-1 é um fator protetor e indutor da apoptose de células potencialmente malignas e que a superexpressão de COX-2 e acúmulo de p53 seriam indutores de proliferação celular, angiogênese, que corroboraria para o possível surgimento de câncer. A avaliação conjunta dessas proteínas em focos de lesão de PIA no cão é inédita na literatura e o presente trabalho demonstra que nos focos de PIA no cão há acúmulo da proteína p53, combinada com aumento da expressão de COX-2 e GSTP-1, que pode ocorrer pelo estresse oxidativo, devido à presença do infiltrado inflamatório, podendo então, o epitélio prostático ser foco de alteração genética e transformação neoplásica. O epitélio adjacente,

morfologicamente normal, pode já ter sofrido danos nestas vias metabólicas, que induziriam a lesão celular, em momentos subseqüentes.

Palavras chave: PIA, cão, p53, COX-2, GSTP-1

ABSTRACT

Man and dog share the same environment and develop spontaneously with advancing age prostatic lesions such as benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. Therefore, the dog should be used as a model for a better understanding of prostate carcinogenesis in humans of possible therapeutic alternatives. The study of pre-neoplastic lesions is important to understand the evolution of the carcinogenic process aimed at early diagnosis of tumors. In men, prostatic intraepithelial neoplasia high grade (HGPIN) and proliferative inflammatory atrophy (PIA) are considered precursor lesions of prostatic carcinoma. In dogs, there are descriptions of HGPIN and carcinoma. In our experience, the higher incidence of dysplastic lesions in the dog is the PIA. This study aimed to evaluate the immunostaining of p53, COX-2 and GSTP-1 in foci of proliferative inflammatory atrophy (PIA) of canine prostates and morphologically normal acini adjacent to foci of PIA in order to verify the potential pre- this malignant microenvironment. It was selected 11 canine prostates with areas of PIA, based on the description of De Marzo et al. (2006). The following antibodies were used: anti-p53 (NCL-p53-CM1), anti-GSTP-1 (RB-050-A Glutathione S-transferase, pi-Ab-1), anti-COX-2 (Cyclooxygenase-2 clone : CX-294). We used the nonparametric t test and were considered significant for p values <0.05. Antibodies GSTP-1, COX-2 and p53 expression showed rich and heterogeneous in both normal epithelial cells as foci PIA. Antibodies GSTP-1, COX-2 and p53 expression showed rich and heterogeneous in both normal epithelial cells as foci PIA. There was no significant difference between the mean of p53 immunostaining in foci of PIA and adjacent normal epithelium. The evolution of foci of PIA for carcinoma, or even the adjacent normal epithelium (but with accumulation of p53, COX-2 and GSTP-1) associated with information of low frequency of prostate cancer in dogs makes us believe that the increase in expression of GSTP-1 is a protective factor and inducer of apoptosis of premalignant cells and that overexpression of COX-2 and accumulation of p53 would induce cell proliferation, angiogenesis, thereby confirming that for the possible development of cancer. The joint assessment of these proteins into foci of PIA lesions in the dog is new in the literature and this work demonstrates that the foci of PIA in the dog there is an accumulation of p53 protein combined with increased expression of COX-2 and GSTP-1, which can occur by oxidative stress due to the presence of inflammatory infiltrates, thus, the prostatic epithelium be the focus of genetic and neoplastic transformation. The

epithelium adjacent morphologically normal, may have suffered damage in these pathways, which induce cellular injury in subsequent moments.

Keywords: PIA, dog, p53, COX-2, GSTP-1

INTRODUÇÃO:

Em 1999, uma nova definição, atrofia inflamatória proliferativa (PIA), foi proposta e considerou-se precursora da PIN e do carcinoma⁵. Outras lesões consideradas possivelmente pré-malignas nos homens também têm sido avaliadas quanto a esse potencial, entre elas a atrofia inflamatória proliferativa (PIA)^{28, 22, 7, 26}.

O homem e o cão são provavelmente as únicas espécies a desenvolver espontaneamente o câncer prostático, compartilhando diversas características clínicas e patológicas da doença, embora haja relatos isolados da ocorrência em outras espécies como símios e felinos¹⁶.

A relação funcional entre inflamação e câncer já vem sendo avaliada⁴. Pesquisadores^{4, 19} descreveram que independentemente da etiologia, os processos inflamatórios podem ser carcinogênicos por causarem danos celulares genotóxicos e não genotóxicos, criando no tecido um microambiente rico em citocinas e fatores de crescimento que podem aumentar a proliferação celular e angiogênese.

No homem, lesões genômicas somáticas, incluindo alterações numéricas do cromossomo oito e aumento da frequência de ilhas de hipermetilação CpG do gene GSTP-1 são encontradas nas células de PIA e são similares às aquelas nas células de PIN e carcinoma³⁰.

O gene GSTP-1 codifica uma enzima que atua como um detoxificante carcinogênico. GSTP-1 é descrito como um gene “guardião”, pois protege a célula ativamente de dano oxidativo do genoma mediado pelos componentes carcinogênicos^{19, 15}.

No epitélio prostático normal humano, a expressão de GSTP-1 está geralmente restrita às células basais. As células luminais podem ser induzidas a expressar GSTP-1 face ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Epitélio prostático maligno, no entanto, raramente expressa GSTP-1 devido à ilha de hipermetilação CpG na região promotora do gene GSTP-1^{2, 19}.

Hussain et al.¹² realizaram estudo relacionando a ciclooxigenase-2 (COX- 2) com o desenvolvimento e prevenção do câncer em outros tecidos. Os resultados obtidos sugerem possível papel da ciclooxigenase-2 no processo de progressão da lesão pré-neoplásica ou neoplasia benigna em neoplasia maligna, além de induzir uma variedade de estímulos mitogênicos e inflamatórios²¹.

Wang et al.³⁰ mostraram que as células luminais epiteliais da PIA super expressaram COX-2 e tiveram aumento da expressão dos níveis de Bcl-2, corroborando com o papel pré neoplásico desta lesão em humanos.

O gene supressor de tumor *TP53* é o gene mais comumente mutado em neoplasias do homem. Sob condições de dano ao DNA, a proteína p53 selvagem (constitutiva) pode tanto induzir apoptose quanto parar o ciclo celular para que ocorra o reparo do DNA. Mutação do gene *TP53* resulta em perda de sua função^{54,36}. A proteína p53 mutada tem meia vida prolongada, o que culmina em acúmulo anormal desta no núcleo e a presença da p53 mutante pode ser detectada indiretamente por métodos de imunoistoquímica.

Em nossa experiência a lesão displásica de maior incidência no cão é a PIA^{9, 23}. Como ela é considerada como precursora do câncer prostático no homem^{17, 7} e o cão é o melhor modelo natural de estudo das afecções prostáticas, este trabalho teve por objetivo avaliar a imunomarcagem de p53, COX-2 e GSTP-1 em focos de atrofia inflamatória (PIA) em próstatas caninas e em ácinos morfologicamente normais adjacente aos focos de PIA, a fim de verificar o potencial pré-maligno deste microambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

O material utilizado consistiu de fragmentos de próstata canina com áreas de atrofia inflamatória proliferativa, baseados na descrição de De Marzo et al.⁷. Estas glândulas foram selecionadas dos arquivos, do grupo de estudos em afecções prostáticas caninas, da FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, no período de 2004 a 2009 e da Escola de Veterinária da UFG, Goiânia, GO. O material de arquivo foi revisado por quatro patologistas GBC, MMPR, MBRF, RLA e deste, selecionou-se 11 casos.

IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica seguiram o protocolo descrito por Hsu et al.,1981,¹³ com adaptações do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ, Unesp, Botucatu. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti- p53 (NCL-p53-CM1,

Novocastra,); anti-GSTP-1(RB-050-A Glutathione S-Transferase, pi-Ab-1, LabVision); anti-COX-2 (Cyclooxygenase-2 clone: CX-294). A recuperação antigênica foi feita em solução Citrato 10mM, pH6,0 em câmara de pressão Pascal®, bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3% em metanol, por 20 minutos e bloqueio de proteínas inespecíficas com Protein Block® (DakoCytomation,REF X0909) por 30 minutos. A incubação foi feita por 18 horas a 4°C, seguindo-se com o uso do complexo Advance®(DakoCytomation, REF K4068) e cromógeno DAB® (DakoCytomation, REF K3468), de acordo com indicações do fabricante. As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris e por 30 segundos e desidratadas e montadas com lamínula.

Como controle positivo utilizou-se uma amostra de carcinoma de células escamosas canino, sabidamente positivo para p53, rim de cão para COX-2 e para GSTP fígado de cão (conforme indicações do fabricante). O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por imunoglobulina da espécie em que o respectivo anticorpo primário foi fabricado (Ig Coelho – DakoCytomation REF X0903 para p53 e GSTP) e Ig camundongo, (DakoCytomation REF N1698 para COX-2).

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA IMUNOMARCAÇÃO DE P53

As lâminas foram levadas a um microscópio óptico Leica DMR®, na objetiva de 40x, acoplado a um sistema de análise de imagens constituído por uma câmera digital Leica DFC 500® e o software de análise de imagens Leica QWin v3.0. Considerou-se como imunomarcacão positiva núcleos fortemente marrons para p53. Contou-se, em 200 células epiteliais de ácinos normais adjacentes ao foco de PIA, o numero de células positivas e negativas. O mesmo procedimento foi realizado para os focos de PIA.

AVALIAÇÃO POR ESCORE DA IMUNOMARCAÇÃO DE GSTP-1 E COX-2

A imunomarcacão positiva foi considerada pela coloração castanha do citoplasma das células epiteliais. O mesmo sistema de análise de imagens foi utilizado para este fim. Cinco campos de 20X foram avaliados da seguinte forma nos focos de PIA e epitélio normal adjacente: através de uma escala numérica de 0-3, em que zero representa expressão de GSTP-1 e COX-2 só pelas células basais; 1 imunomarcacão em menos de um terço das células luminais; 2 de um a dois terços e 3 expressão em mais de dois terços das células luminais, de acordo com Wang et al., 2009.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao programa computacional GraphPad InStat 3®, utilizando-se o Qui-quadrado grau de liberdade 1 para comparar se houve diferença estatística entre o percentual de células marcadas dos focos de PIA e ácinos adjacentes normais para o anticorpo primário p53 e escore de marcação para GSTP-1 e COX-2.

RESULTADOS

O anticorpo p53 mostrou expressão nuclear rica e heterogênea tanto nas células epiteliais normais como nos focos PIA (Fig.1). A média do percentual de positividade para p53 foi de 78,84% nos focos de PIA e 72,95% no epitélio prostático normal (Tabela 1). Não houve diferença estatística significativa entre as médias de imunomarcação de p53 nos focos de PIA e epitélio normal adjacente.

Os anticorpos GSTP-1 e COX-2 apresentaram expressão citoplasmática rica e heterogênea tanto nas células epiteliais normais como nos focos de PIA (Figura 1). A média do escore de marcação para COX-2 e GSTP1 foi 2,87 e 2,21 nos focos de PIA e 2,89 e 2,25 no epitélio normal adjacente, respectivamente (Tabela 1).

Não houve diferença estatística entre o percentual de células marcadas para p53 nos focos de PIA e epitélio morfolologicamente normal adjacente. Porém, observa-se que o epitélio normal tem menor valor de células marcadas, 17,7, do que os focos de PIA.

Tabela 1: Média de escore e percentual de células marcadas para COX-2, GSTP1 e p53 nos focos de PIA e epitélio normal adjacente.

Diagnóstico	Média do Escore de marcação COX-2	Média do Escore de marcação GSTP1	Média do % de marcação p53
Foco PIA	2,87±0,25	2,21±0,42	78,84±16,72
Epitélio normal adjacente	2,89±0,20	2,25±0,40	72,95±24,24

DISCUSSÃO

Tanto os focos de PIA como o epitélio normal adjacente apresentaram elevada imunomarcção para as proteínas estudadas, sem diferença estatística entre as áreas avaliadas. Este fato pode ser considerado um epifenômeno, uma vez que o epitélio considerado morfológicamente normal divide o mesmo microambiente que o foco de PIA, e os mediadores inflamatórios produzidos e liberados pelas células podem agir de forma exócrina e iniciar uma resposta à injúria no epitélio adjacente.

O percentual de positividade para a proteína p53 foi elevado nas áreas de PIA e epitélio normal adjacente (78,84 e 72,95, respectivamente). O acúmulo da proteína mutante é fator de prognóstico ruim, pois a parada do ciclo celular para eventuais correções da fita de DNA e o estímulo à apoptose estarão ausentes nesta célula, por mutação do gene *TP53*, considerado o “guardião do genoma”³⁰.

Em humanos, a expressão de p53 está relacionada a índices proliferativos mais elevados no câncer prostático e na HGPIN e a um fenótipo mais agressivo no câncer e sua mutação já foi detectada em focos de PIA^{3, 27}.

Stricker et al.²⁵ relataram que adenocarcinomas prostáticos em humanos, positivos para p53 têm maior probabilidade de progressão da doença, o que corrobora com o potencial pré-maligno dos focos de PIA, que em nosso estudo foram reativos para esta proteína.

A COX-2, um metabólito do ácido aracdônico, pode ser produzida nos processos inflamatórios e por células neoplásicas, o que estimula a proliferação celular, angiogênese e inibe a apoptose¹⁷.

Na literatura há dados controversos quanto à expressão de COX-2 no epitélio prostático normal, atípico e neoplásico de humanos. De acordo com Hussain et al.¹² não houve diferença entre a imunomarcção de COX-2 em PIN, carcinoma e epitélio normal. Gupta et al.¹¹ demonstram elevada expressão em carcinomas prostáticos, enquanto Zha et al.³¹ relatam níveis baixos ou ausentes desta proteína.

Kirchembaum et al.¹⁴ descrevem marcação somente na musculatura lisa e raras células basais de próstatas normais do homem, porém as células lumbais passam a ser positivas quando em áreas de infiltrado inflamatório, o que corrobora com os achados de nosso estudo, por se tratar de epitélio morfológicamente normal, porém adjacente ao foco inflamatório.

Já Wang et al.²⁹ encontraram evidências de que a regulação da COX-2 é feita através das células lumbais epiteliais adjacentes a focos de inflamação crônica com

tipos diferentes de atrofia pós inflamatória das células epiteliais. Essas tiveram uma alta taxa de proliferação e regulação do gene anti-apoptótico *Bcl-2*, produzindo mudanças que caracterizaram os tumores e lesões pré-cancerosas prostáticas. Tais achados sugerem que a inflamação crônica deve estar envolvida na patogênese precoce do câncer de próstata.

A GSTP-1 é induzida na resposta oxidativa e deve estar aumentada nos focos de PIA, pelo infiltrado inflamatório presente²⁰.

Nas áreas de PIA, a maior imunomarcagem de GSTP-1 (média do escore de marcação 2,2) é esperada, uma vez que sugere a existência de estresse oxidativo na área, devido ao microambiente inflamatório. Este resultado é concordante com dados da literatura humana³⁰.

No entanto, Nakayama et al.¹⁷, encontraram diminuição de GSTP-1 nas áreas de PIA e propuseram que a ausência da expressão de GSTP-1 pode ser consequência da hipermetilação das ilhas CpG. Os resultados obtidos mostraram que as mudanças na hipermetilação ocorrem em algumas lesões de PIA e sugerem evidências moleculares de que estas iniciaram a progressão para HGPIN e/ou adenocarcinoma prostático.

Em nossos estudos^{8, 9, 23} e na literatura mais recente consultada sobre afecções prostáticas no cão, é descrito uma baixa frequência de focos de PIN e carcinoma^{24, 1, 16}. Várias hipóteses podem ser levantadas a este respeito, e uma delas seria a alta reatividade do epitélio prostático nos focos de PIA ao GSTP-1, que atuaria como protetor aos danos de espécies reativas do oxigênio, evitando lesões no material genético (iniciação celular).

No epitélio normal, adjacente, também se observou alto escore de marcação para GSTP-1 (média 2,25). Tal fato pode ser justificado pelo microambiente, como no caso do COX-2, ou em resposta ao aumento de proteínas pró-inflamatórias nestas células e este aumento ser um epifenômeno.

Wang et al.³⁰ comentaram sobre o acúmulo de p53 e expressão aumentada de GSTP-1, que poderia induzir a apoptose dessas células, por outros mecanismos, que não a via do p53, como por exemplo danos mitocôndrias por radicais livres, com a subsequente liberação de citocromo C que ativará a apoptose pela via das caspases. Já aquelas células que acumulam p53, mas não expressam GSTP-1 podem ser alvo de alterações genéticas e transformação neoplásica.

Estes resultados nos fazem pensar, que o estudo de um biomarcador ou um grupo pequeno deles, pode não explicar ou elucidar a progressão tumoral, em diferentes

modelos. Devemos levar em consideração as vias envolvidas e o conhecimento de que no organismo vias alternativas são responsáveis por resultados biológicos semelhantes.

A evolução dos focos de PIA para carcinoma, ou mesmo do epitélio adjacente normal (porém com acúmulo de p53, COX-2 e GSTP-1) associado à informação da baixa frequência de câncer de próstata na espécie canina^{24, 1, 16} nos faz questionar se o aumento de expressão de GSTP-1 é um fator protetor e indutor da apoptose de células potencialmente malignas e a superexpressão de COX-2 e acúmulo de p53 seriam indutores de proliferação celular, angiogênese, que corroboraria para o surgimento de câncer.

A avaliação conjunta dessas proteínas em focos de lesão de PIA no cão é inédita na literatura e o presente trabalho demonstra que nos focos de PIA no cão há acúmulo da proteína p53, combinada com aumento da expressão de COX-2 e GSTP-1, que pode ocorrer pelo estresse oxidativo, devido à presença do infiltrado inflamatório, podendo então, o epitélio prostático ser foco de alteração genética e transformação neoplásica. O epitélio adjacente, morfollogicamente normal, pode já ter sofrido danos nestas vias metabólicas, que induziriam a lesão celular, em momentos subseqüentes.

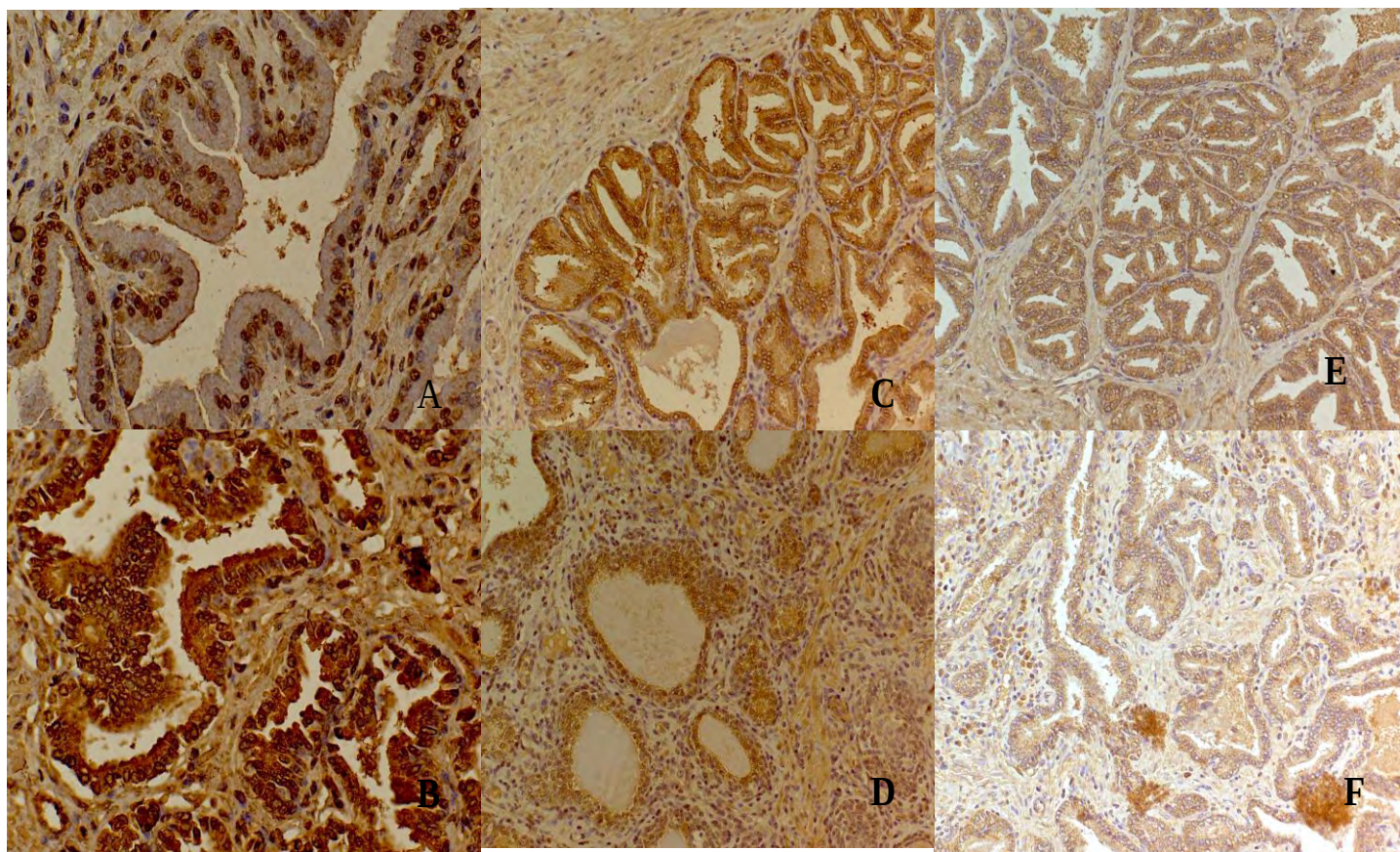


Figura 1 – Próstata de cão. Epitélio normal adjacente aos focos de PIA (A,C e E) e focos de PIA (B, D e F). A e B – Imunomarcção positiva para p53. Notar núcleo das células epiteliais luminais e basais positivos. DAB, contra-coloração Hematoxilina de Harris, obj 40x. C e D – Imunomarcção positiva para GSTP-1. Notar marcação citoplasmática difusa nas células epiteliais. DAB, contra-coloração Hematoxilina de Harris, obj, 20x. E e F - Imunomarcção positiva

REFERÊNCIAS

- 1 ARGYLE, D. Prostate cancer in dog and men: a unique opportunity to study the disease. *The Veterinary Journal*. V. 180, p. 137-138, 2009.
- 2 BROOKS, J.D.; WEINSTEIN,M.; LIN, X.; SUN, Y.; PIN, S.S.; BOVA, G.S.; EPSTEIN, J.I.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. CG Island Methylation Changes Near the GSTP1 Gene in Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 7, 531-536, 1998.
- 3 CHENG, L. p53 overexpression is associated with increased cell proliferation in patients with locally recurrent prostate carcinoma after radiation therapy. *Cancer*, v. 85, p. 1293-99, 1999.
- 4 COUSSENS, L.M. et.al. Inflammation and cancer. *Nature*. v. 20,p.860-867,2002.
- 5 DE MARZO, A.M.; MARCHI, VL; EPSTEIN, JI; NELSON, WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for carcinogenesis. *Am J Pat*, v. 155, n. 6, p.1985-1992, 1999.
- 6 DE MARZO et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. v. 62, p.55-62, 2003.
- 7 DE MARZO et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol*, v. 30, n.10, p. 1281-1291, 2006.
- 8 DE MOURA, V.M.B.D. Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos. Botucatu, 2004. 144 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 9 DI SANTIS, G.W. Padrão histopatológico, perfil imunoistoquímico e potencial pré-maligno das lesões displásicas da próstata canina. Botucatu, 2007. 132p. Tese

(Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

10 FAITH, D.; HAN, S.; LEE, D.K.; FRIEDL, A.; HICKS, J.L.; DE MARZO, A.; JARRARD, D.F. p16 is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *The prostate*, v.65, p. 73-82, 2005.

11 GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; AHMAD, N.; BOSTWICK, D.G.; MUKHTAR, H. Over-expression of cicloxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate*, v.42, p.73-78, 2000.

12 HUSSAIN, T.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Letters*, v.191, p.125-135, 2003.

13 HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v.29, n 11, p.1349-1353, 1981.

14 KIRSCHENBAUM, A.; LIOTTA, D.R.; YAO, S.; LIU, X.H.; KLAUSNER, A.P.; UNGER, P.; SHAPIRO, E.; LEAV, I.; LEVINE, A.C. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, v.85, p.3436-41, 2000.

15 KOLLERMANN, J. et al. Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer. *BMC Urol*, v.6, p.1471-1477, 2006.

16 LE ROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. *The Veterinary Journal*, v.10, 2009.

17 NAKAYAMA, M; BENNETT, C.J; HICKS, J.L; EPSTEIN, J.I; PLATZ, E.A; NELSON, W.G; DE MARZO, A.M. Hypermethylation of the human glutathione S-

transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: A detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 2003. V.163(3), p.923–933, 2003.

18 NARAYANAN, B.A.; NARAYANAN, N.K.; PTTMAN, B.; REDDY, B.S. Adenocarcinoma of the Mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors envolved in COX-2 inhibition. *The prostate*, v.66, p.257-265, 2006.

19 PALAPATTU, G.S. et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*. v.26, n.7, p.1170-1181, 2004.

20 PARSONS, J.K; NELSON, C.P.; GAGE, W.R.; KENSLER, T.W.; DE MARZO, A.M. GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. *Prostate*. V.49, p. 30-37, 2001.

21 PATEL, M.I.; SUBBARAMAIAH, K.; DU, B.; CHANG, M.; YANG, P.; NEWMAN, R.A.; CORDON-CARDO, C.; THALER, H.T.; DANNENBERG, A.J. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of cyclooxygenase-2 independent mechanism. *Clinical cancer research*, v.11, p.1999-2007, 2005.

22 PLATZ, E.A; DE MARZO, A.M. Epidemiology of inflammation and prostate câncer. *J Urol*, v. 171, p. S36-S40, 2004;

23 RODRIGUES, M.M.P. Imunomarcção de COX-2 e TGF- β nas lesões proliferativas da próstata do cão. Botucatu, 2007, 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

24 ROSSIGNOL, A.; VILLERS, A.; MOLINIÉ, V.; MAZEROLLES, C.; PRADÈRE, M.; DELVERDIER, M. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien.Validité du modèle animal pour l'étude des lesions précancéreuses. *Revue Méd. Vét.*, v.155, p.21-26, 2004.

25 STRICKER, H.J.; JAY, J.K.; LINDEN, M.D.; TAMBOLI, P.; AMIN, M.B. Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. *Urology*, v. 47, p. 366-69, 1996.

26 TOMAS, D. et al. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. *European Urology*. p.1425-1431, 2006.

27 TSUJIMOTO, Y.; TAKAYAMA, H.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A.; AOZASA, K. Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: Histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. *Prostate*, v. 52, p. 279-287, 2002.

28 VAN LEENDERS, G.J.L.H.; GAGE, W.R.; HICKS, J.L.; VAN BALKEN, B.; AALDERS, T.W.; SCHALKEN, J.A.; DE MARZO, A.M. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol*, v. 162, n.5, p. 1529-1537, 2003.

29 WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J-E. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. *The Prostate*, v.61, p. 60-72, 2004.

30 WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J-E. Increased p53 immunoreactivity in proliferative inflammatory atrophy of prostate is related to focal acute inflammation. *APMIS*, v.117. p.185-195, 2009.

31 ZHA, S.; GAGE, W.R.; SAUVAGEOT, J.; SARIA, E.A.; PUTZI, M.J.; EWING, C.M.; FAITH, D.A.; NELSON, W.G. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res.*, v.61, p.8617-23, 2001.

DISCUSSÃO GERAL

A próstata é sítio de diversas afecções, dentre elas a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN), considerada precursora do câncer prostático (ROSSIGNOL et al., 2004).

Waters & Bostwick (1997) descrevem um alto índice desta lesão em cães, entretanto nosso trabalho revelou baixa incidência (8,61%) concordando com os dados de Rossignol et al. (2004) e Argyle (2009).

Assim como descrito na literatura, registramos focos de PIN adjacentes aos carcinomas prostáticos, anuindo com a teoria de que a HGPIN seja uma lesão pré-neoplásica (Waters & Bostwick, 1997) e, como nos humanos, onde há focos de HGPIN, há carcinoma.

Na literatura veterinária, a ocorrência de HGPIN e carcinoma varia de 30% a 72% (Waters et al., 1997, Aquilina et al., 1998, Madwell et al. 2004). No entanto, no estudo de Aquilina et al. (1998) e Madwell et al. (2004) 0% e 3% dos cães com carcinoma, diagnosticado histologicamente, respectivamente, apresentaram focos de PIN.

Morfologicamente, a maioria dos carcinomas prostáticos caninos observados neste estudo era do tipo acinar pequeno, de acordo com o descrito Lai et al., 2008. Este foi o tipo de tumor mais freqüente na casuística destes autores. De acordo com Le Roy et al., 2007, uma complicação do diagnóstico das neoplasias prostáticas no cão é a similaridade histológica com o epitélio da bexiga (células de transição), porém não observamos nenhuma das neoplasias prostáticas deste estudo com este aspecto e sim, o aspecto histopatológico dos carcinomas eram semelhantes aos tumores do homem grau 1 e 2 de Gleason ou do tipo acinar pequeno.

Porém, ao contrário do descrito por estes autores, os tumores não ocupavam toda a próstata e não se observou invasão da cápsula ou tecido adjacente em um número significativo de amostras. Le Roy et al. (2009) também citam que os carcinomas prostáticos são dispersos por toda a glândula e costumam envolver a uretra prostática e a

Goiânia, Goiás, como parte do grupo de estudo em afecções prostáticas do cão (Escola de Veterinária, UFG).

Acreditamos que diferenças como esta (da invasão de toda a glândula x focos de carcinoma) se deva ao tipo de material coletado, pois neste estudo, coletávamos as próstatas inteiras, seccionadas a cada centímetro, sendo toda ela incluída em parafina, o que possibilitou encontrarmos focos de neoplasia, que passariam sem diagnóstico, em uma análise macroscópica ou clínica. Outro ponto interessante foi a origem das neoplasias, de cães de Goiânia, o que nos faz pensar em fatores ambientais, como poluição, que interfiram diretamente com o processo de carcinogênese prostática.

Observamos que de 80 casos avaliados, 63,75% (51 casos), as glândulas apresentaram volume entre 0 e 20 cm³, o que nos leva a crer que o tamanho da glândula pode não estar relacionado com o surgimento das lesões.

Em nossos estudos (De Moura, 2004, Rodrigues, 2007 e Di Santis, 2007) e na literatura mais recente consultada sobre afecções prostáticas no cão, é descrito uma baixa frequência de focos de PIN e carcinoma (Rossignol et al., 2004, LeRoy & Northrup, 2009, Argyle, 2009). Várias hipóteses podem ser levantadas a este respeito, e uma delas seria a alta reatividade do epitélio prostático nos focos de PIA ao GSTP-1, que atuaria como protetor aos danos de espécies reativas do oxigênio, evitando lesões no material genético (iniciação celular).

O percentual de positividade para a proteína p53 foi elevado em todas as áreas. Porém, quando avaliamos a imunomarcagem para esta proteína superior a 50% (escores 3 e 4), observamos que os focos de PIA e carcinomas tiveram mais de 95% das amostras nestes valores. O acúmulo da proteína mutante é fator de prognóstico ruim, pois a parada do ciclo celular para eventuais correções da fita de DNA e o estímulo à apoptose estarão ausentes nesta célula, por mutação do gene *TP53*, considerado o “guardião do genoma” (Wang et al., 2009).

Em humanos, a expressão de p53 está relacionada a índices proliferativos mais elevados no câncer prostático e na HGPIN e a um fenótipo mais agressivo no câncer (Cheng et al., 1999) e sua mutação já foi detectada em focos de PIA (TSUJIMOTO et al., 2002).

Stricker et al. (1996) relatam que adenocarcinomas prostáticos em humanos, positivos para p53 têm maior probabilidade de progressão da doença, o que corrobora

com o potencial maligno dos focos de PIA, que em nosso estudo foram reativos para esta proteína.

Por outro lado, a avaliação imunoistoquímica da proteína p53 não é uma ferramenta muito precisa para correlacionar sua expressão em lesões prostáticas. Isso se deve por dois fatores: meia vida curta da proteína o que torna difícil sua identificação no tecido e a uma possível reação cruzada entre as formas selvagem e mutante como demonstrado por Wang et al.,2009.

A evolução dos focos de PIA para carcinoma, ou mesmo do epitélio adjacente normal (porém com acúmulo de p53, NOS-2, COX-2 e GSTP-1) associado à informação da baixa frequência de câncer de próstata na espécie canina (Rossignol et al., 2004, LeRoy & Northrup, 2009, Argyle, 2009) nos faz questionar se o aumento de expressão de GSTP-1 é um fator protetor e indutor da apoptose de células potencialmente malignas ou se a superexpressão de NOS-2 e COX-2 e acúmulo de p53 seriam indutores de proliferação celular, angiogênese, que corroboraria para o surgimento de câncer.

A evolução dos focos de PIA para carcinoma, ou mesmo do epitélio adjacente normal (porém com acúmulo de p53, COX-2 e GSTP-1) associado à informação da baixa frequência de câncer de próstata na espécie canina (Rossignol et al., 2004, LeRoy & Northrup, 2009, Argyle, 2009) nos faz questionar se o aumento de expressão de GSTP-1 é um fator protetor e indutor da apoptose de células potencialmente malignas ou se a superexpressão de COX-2 e acúmulo de p53 seriam indutores de proliferação celular, angiogênese, que corroboraria para o surgimento de câncer.

A avaliação conjunta dessas proteínas em focos de lesão de PIA no cão é inédita na literatura e o presente trabalho demonstra que nos focos de PIA no cão há acúmulo da proteína p53, combinada com aumento da expressão de NOS-2, COX-2 e GSTP-1, que pode ocorrer pelo estresse oxidativo, devido à presença do infiltrado inflamatório, podendo então, o epitélio prostático ser foco de alteração genética e transformação neoplásica. O epitélio adjacente, morfológicamente normal, pode já ter sofrido danos nestas vias metabólicas, que induziriam a lesão celular, em momentos subseqüentes.

CONCLUSÕES GERAIS

Os carcinomas prostáticos do cão e a PIA apresentam maior número de amostras com mais de 75% das células positivas para NOS-2 e COX-2, demonstrando o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento dessas lesões.

As próstatas normais de cães, bem como as afecções desta glândula (HPB, PIA, PIN, prostatite e carcinoma) expressam a proteína GSTP-1, o que confere proteção ao tecido prostático canino a danos oxidativos.

A proteína p53 está presente em todas as amostras estudadas, incluindo o tecido prostático normal, porém as lesões prostáticas apresentaram maior número de amostras com escores mais elevados de marcação.

REFERÊNCIAS

ARGYLE, D. Prostate cancer in dog and men: a unique opportunity to study the disease. **The Veterinary Journal**. V. 180, p. 137-138, 2009.

BALTACI et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign prostatic hyperplasia, low- and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. **BJU International**. V 88, p.100-103, 2001.

BOSTWICK, D.G. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the most likely precursor of prostate cancer. **Cancer**, v. 75, p. 1823-36, 1995

BROOKS, J.D.; WEINSTEIN,M.; LIN, X.; SUN, Y.; PIN, S.S.; BOVA, G.S.; EPSTEIN, J.I.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. CG Island Methylation Changes Near the GSTP1 Gene in Prostatic Intraepithelial Neoplasia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 7, 531-536, 1998.

CHENG, L. p53 overexpression is associated with increased cell proliferation in patients with locally recurrent prostate carcinoma after radiation therapy. **Cancer**, v. 85, p. 1293-99, 1999.

COUSSENS, L.M. et.al. Inflammation and cancer. **Nature**. v. 20,p.860-867,2002.

DE MARZO, A.M.; MARCHI, VL; EPSTEIN, JI; NELSON, WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for carcinogenesis. **Am J Pat**, v. 155, n. 6, p.1985-1992, 1999.

DE MARZO et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. **Urology**. v. 62, p.55-62, 2003.

DE MARZO et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n.10, p. 1281-1291, 2006.

DE MOURA, V.M.B.D. Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos. Botucatu, 2004. 144 p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DI SANTIS, G.W. Padrão histopatológico, perfil imunoistoquímico e potencial pré-maligno das lesões displásicas da próstata canina. Botucatu, 2007. 132p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

FAITH, D.; HAN, S.; LEE, D.K.; FRIEDL, A.; HICKS, J.L.; DE MARZO, A.; JARRARD, D.F. p16 is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. **The prostate**, v.65, p. 73-82, 2005.

GRANDINI, R; REALACCI, M; GINEPRI, A.; NASO, G.; SANTANGELO, C.; CELA, O.; SALE, P.; BERARDI, A.; PETRANGELI, E.; GALLUCCI, M.; DI SILVERIO, F.; RUSSO, M. A.Nitric Oxide Synthases In Normal And Benign Hyperplastic Human Prostate: Immunohistochemistry And Molecular Biology. **J. Pathol.** v 189, p. 224–229, 1999.

GUPTA, S.; SRIVASTAVA, M.; AHMAD, N.; BOSTWICK, D.G.; MUKHTAR, H. Over-expression of cicloxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. **Prostate**, v.42, p.73-78, 2000.

HSU, S.M.; RAINE, L. Protein A, Avidin, and Biotin in Immunohistochemistry. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, n 11, p.1349-1353, 1981.

HUSSAIN, T.; GUPTA, S.; MUKHTAR, H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.191, p.125-135, 2003.

JENKINS, D.C., et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc Natl Acad Sci**, v 92, p. 4392-4396, 1995.

KIRSCHENBAUM, A.; LIOTTA, D.R.; YAO, S.; LIU, X.H.; KLAUSNER, A.P.; UNGER, P.; SHAPIRO, E.; LEAV, I.; LEVINE, A.C. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts. **J.Clin.Endocrinol.Metab.**, v.85, p.3436-41, 2000.

KLOTZ, T.; BLOCH, W.; VOLBERG, C.; ENGELMAN, U.; Addicks, K. Selective Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Prostate Carcinoma. **Cancer**. V.82, n.10, p.1897-1903, 1998.

KOLLERMANN, J. et al. Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer. **BMC Urol**, v.6, p.1471-1477, 2006.

LE ROY, B. E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal**, v.10, 2009.

MADEWELL, B. R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; DEVERE WHITE, R.W. Canine Prostatic Intraepithelial Neoplasia: Is the Comparative Model Relevant? **The Prostate**. V. 58, p.314-317, 2004.

McNEAL, J.E.; BOSTWICK, D.G. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of MIKUZ, G. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. **European Urology**, p.1425-1431, 2006.

NAKAYAMA, M; BENNETT, C.J; HICKS, J.L; EPSTEIN, J.I; PLATZ, E.A; NELSON, W.G; DE MARZO, A.M. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: A detailed study using laser-capture microdissection. **Am J Pathol** 2003. V.163(3), p.923–933, 2003.

NARAYANAN, B.A.; NARAYANAN, N.K.; PTTMAN, B.; REDDY, B.S. Adenocarcinoma of the Mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation

of transcription factors involved in COX-2 inhibition. **The prostate**, v.66, p.257-265, 2006.

OLSON, P.N. et al. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. **Comp. Cont. Ed.**, v.9, p.613-23, 1987.

PALAPATTU, G.S. et al. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**. v.26, n.7, p.1170-1181, 2004.

PARSONS, J.K; NELSON, C.P.; GAGE, W.R.; KENSLER, T.W.; DE MARZO, A.M. GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. **Prostate**. V.49, p. 30-37, 2001.

PATEL, M.I.; SUBBARAMAIAH, K.; DU, B.; CHANG, M.; YANG, P.; NEWMAN, R.A.; CORDON-CARDO, C.; THALER, H.T.; DANNENBERG, A.J. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of cyclooxygenase-2 independent mechanism. **Clinical cancer research**, v.11, p.1999-2007, 2005.

PLATZ, E.A; DE MARZO, A.M. Epidemiology of inflammation and prostate câncer. **J Urol**, v. 171, p. S36-S40, 2004;

RODRIGUES, M. M. P. ; DI SANTIS, G. W.; DE MOURA, V. M. B.; BANDARRA, E. P.; LAUFER-AMORIM, R. Neoplasia Intra-epitelial prostática: aspectos morfológicos e moleculares. **Veterinária e Zootecnia (UNESP)**, v. 17, p. 19-25, 2010.

RODRIGUES, M.M.P. Imunomarcção de COX-2 e TGF- β nas lesões proliferativas da próstata do cão. Botucatu, 2007, 52p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

ROSSIGNOL, A.; VILLERS, A.; MOLINIÉ, V.; MAZEROLLES, C.; PRADÈRE, M.; DELVERDIER, M. Histologie et immunohistochimie de la prostate du chien. Validité du modèle animal pour l'étude des lésions précancéreuses. **Revue Méd. Vét.**, v.155, p.21-26, 2004.

SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISON, A.; CROCKER, J. The effect of a series of fixative on the AgNOR technique. **J Pathol**, v. 155, p. 109-12, 1999.

STRICKER, H.J.; JAY, J.K.; LINDEN, M.D.; TAMBOLI, P.; AMIN, M.B. Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. **Urology**, v. 47, p. 366-69, 1996.

SUGAR, LM. Inflammation and prostate cancer. **Can J Urol**, v.13, n.1, p.46-47, 2006.

SWINNEY, G.R. Prostatic neoplasia in five dogs. **Aust. Vet. J.**, v.76, n.10, p.669-674, 1998 .

TAMBOLI, P. et al. Immunohistochemical expressions of retinoblastoma and p-53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparison with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. **Mod Pathol**, v. 11, n. 3, p. 247-252, 1998.

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. **Mol Cell Endocrinol**. V 197, p. 251-255, 2002.

TOMAS, D.; KRUSLIN, B.; ROGATSCH, H.; SCHAFER, G.; BELICZA, M.;
TOMAS, D. et al. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. **European Urology**. p.1425-1431, 2006.

TSUJIMOTO, Y.; TAKAYAMA, H.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A; AOZASA, K. Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: Histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. **Prostate**, v. 52, p. 279-287, 2002.

UOTILA, P.; VALVE, E.; MARTIKAINEN, P.; NEVALAINEN, M.; NURMI, N; HÄRKÖNEN, P. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. **Urol Research**. V.29, p.25-28, 2001.

VAN LEENDERS, G.J.L.H.; GAGE, W.R.; HICKS, J.L.; VAN BALKEN, B.; AALDERS, T.W.; SCHALKEN, J.A.; DE MARZO, A.M. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. **Am J Pathol**, v. 162, n.5, p. 1529-1537, 2003.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J-E. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. **The Prostate**, v.61, p. 60-72, 2004.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J-E. Increased p53 immunoreactivity in proliferative inflammatory atrophy of prostate is related to focal acute inflammation. **APMIS**, v.117. p.185-195, 2009.

WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. The canine is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. **Antic. Res.**, v. 17, p. 1467-70, 1997a.

WATERS, D.J.; SAKR, W.A.; HAYDEN, D.W.; MAX LANG, C.; MCKINNEY, L.; MURPHY, G.P.; RADINSKY, R.; RAMONER, R.; RICHARDSON, R.C.; TINDALL, D.J. Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. **Prostate**, v. 30, p. 92-7, 1997.

WEINSTEIN, M.H.; EPSTEIN, J. Significance of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia on needle biopsy. **Human Pathology**, v.24, n.6, 624- 629, 1993.

ZHA, S.; GAGE, W.R.; SAUVAGEOT, J.; SARIA, E.A.; PUTZI, M.J.; EWING, C.M.; FAITH, D.A.; NELSON, W.G. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. **Cancer Res.**, v.61, p.8617-23, 2001.

