

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA**

**IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 E TGF- β NAS LESÕES
PROLIFERATIVAS DA PRÓSTATA DO CÃO**

MARCELA MARCONDES PINTO RODRIGUES

**Botucatu - SP
Fevereiro/2007**

MARCELA MARCONDES PINTO RODRIGUES

**IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 E TGF- β NAS LESÕES
PROLIFERATIVAS DA PRÓSTATA DO CÃO**

**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: Profa. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim

Botucatu

2007

MARCELA MARCONDES PINTO RODRIGUES

**IMUNOMARCAÇÃO DE COX-2 E TGF- β NAS LESÕES
PROLIFERATIVAS DA PRÓSTATA DO CÃO**

Banca examinadora:

Renée Laufer Amorim

Veridiana Maria Brianezi Diganani De Moura

Sérgio Luis Felisbino

Botucatu, 16 de fevereiro de 2007.

**“Quando fala o amor, a voz de todos os deuses deixa o céu embriagado
de harmonia” (William Shakespeare)**

**Aos meus pais Wilson Roberto Pinto Rodrigues e Elizabeth Marcondes
Pinto Rodrigues e irmã Carla Marcondes Pinto Rodrigues,
pelo amor que nos une de forma única e sincera.**

**A minha orientadora ...
E o que importa não é o que você tem na vida,
mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a
família que nos permitiram escolher.**

**A minha avó Nilce Del Nero,
“...se chorei ou se sorri, o importante é que emoções eu vivi”.
Sinto sua falta.**

Dedico à vocês este trabalho

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por manter-me sob dedicação exclusiva para o desenvolvimento deste trabalho, além do auxílio financeiro fornecido.

A todos os anjos, santos e a Deus, o “grande arquiteto do Universo” por colocarem em minha vida tantos desafios e aprendizados.

Aos maiores amores da minha vida, meu pai, minha mãe e minha irmã. Pai, com você aprendi o real significado da palavra honestidade. Mãe, amiga, paciente, enfim, meu “porto seguro”. Caci, minha irmã, meu exemplo de vida e dedicação ao trabalho. Amo vocês incondicionalmente.

A minha orientadora, amiga, mãe e conselheira, Renée Laufer Amorim. Da orientação surge a amizade. Obrigada por todas nossas conversas, por suas palavras de incentivo e por sua confiança em mim e no meu trabalho. Talvez não tenha demonstrado esta gratidão, mas pode ter certeza, levarei pra sempre tudo o que me ensinou. Serei eternamente grata à você.

Aos professores do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Noeme Sousa Rocha e Julio Lopes Sequeira, pelos ensinamentos patológicos e por nossos momentos de descontração.

Ao Mestre dos Mestres Enio Pedone Bandarra, por longas conversas, histórias e aprendizados.

Aos meus iniciadores patológicos, Alessandra Hataka, Milton Alves Júnior e Paulo César Gonçalves dos Santos, por depositarem em mim toda confiança fornecida.

Aos funcionários do Serviço de Patologia, Maury Raul (meu irmão mais velho) por sua alegria contagiante e Noel Melo de Almeida por toda ajuda prestada e imediata.

Aos meus fiéis escudeiros, Chopp, Pequeno e Pequena. Não havia como me esquecer de vocês.

Aos meus colegas de residência e hoje amigos, Arlete Benta de Souza, Camila Dias Porto e Leandro Bertoni Cavalcanti Teixeira. Obrigada pelo nosso convívio diário.

A aqueles que apenas no olhar me entendem e sempre estão ao meu lado...Taízha Ciasca, Julio Marcondes, Júnior Russo (Jota) e Alfredo Lima. E aos inesquecíveis Caio Burini, João Ferreira, Leandro Bertoni Cavalcanti Teixeira, Maria do Carmo Vailati, Paola Penteado, Priscila Fantini e Rodrigo Marucio. Obrigada por serem meus amigos. E a todos aqueles aqui não citados, mas que com certeza sabem o quanto são importantes para mim.
“Amigo é coisa pra se guardar no lado esquerdo do peito...”

Aos amigos inesquecíveis de Santos, em especial à Carla Liguori, Marília e Botucatu. A amizade é a grande base da vida.

A Eliete Trombini, conversas, risadas, choros, paixões, aflições e ensinamentos pra vida toda.

Ao amigo e agora estatístico Paulo Felipe Izique Goiozo, muito obrigada por me ajudar em um momento que acreditei estar tudo perdido.

Às amigas prostáticas Veridiana Maria Brianezi Dignani De Moura e Giovana Wingeter Di Santis, por idéias neste trabalho, blocos e longas conversas verdadeiramente amigas.

Ao professor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, João Lauro Vieira pelo auxílio na leitura das lâminas.

A todos aqueles que em algum momento fizeram parte da minha vida.
Aos animais por dividirem conosco o privilégio de terem uma alma.
Obrigada a todos, do fundo do meu coração.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Anatomia e fisiologia prostática	03
2.2. Afecções prostáticas	05
2.3. Cicloxigenase-2 e fator de crescimento transformador- β	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Seleção do material	15
3.2. Imunoistoquímica	16
4. RESULTADOS	
4.1. Avaliação histológica	20
4.2. Avaliação imunistoquímica	26
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	47
7. BIBLIOGRAFIA	48
ANEXOS	56

RODRIGUES, M.M.P. Imunomarcção de COX-2 e TGF- β nas lesões proliferativas da próstata do cão. Botucatu, 2007, 56p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As lesões prostáticas em cães vêm sendo cada vez mais estudadas, uma vez que esta espécie é considerada modelo experimental para afecções prostáticas no homem. As principais são a hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatites, cistos e o adenocarcinoma. Recentemente tem se dado atenção às lesões pré-neoplásicas, dentre elas a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA). Alguns marcadores imunoistoquímicos são utilizados com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de câncer prostático a partir de lesões pré-neoplásicas. A cicloxigenase-2 (COX-2) apresenta papel fundamental na resposta inflamatória e, esta pode ter relação com o desenvolvimento do câncer, além de induzir estímulos mitogênicos, enquanto que o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) induz a angiogênese e inibe a proliferação celular, sendo considerado um mediador do crescimento prostático. No presente trabalho estes marcadores foram utilizados com o objetivo de correlacionar lesões não neoplásicas, pré-neoplásicas e neoplásicas. Os resultados obtidos mostram que as neoplasias e as lesões pré-neoplásicas expressam grande quantidade de COX-2 e TGF- β , o que permite afirmar o papel destas proteínas no desenvolvimento do câncer prostático em cães.

RODRIGUES, M.M.P. COX-2 e TGF- β immunostaining in proliferative disorders of dog prostate. Botucatu, 2007, 56p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Prostatic lesions in dogs are being studied more and more, since the dogs are considered an experimental model for prostatic diseases in humans. The main prostatic diseases are benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic inflammation, cysts and adenocarcinoma. Pre neoplastic lesions are being studied, among them prostatic intra epithelial neoplasia (PIN) and prostatic inflammatory atrophy (PIA). Immunohistochemistry markers are used to evaluate prostatic cancer from pre neoplastic lesions. COX-2 has the main role in inflammatory response and can be involved in cancer development, because it induces mitosis, and TGF- β induces angiogenesis and inhibits cellular proliferation, and is considered a prostatic growth mediator. In this study, these markers were used to correlate non neoplastic lesions, pre neoplastic lesions and prostatic cancer. Our results show that neoplastic and pre neoplastic lesions express high amounts of COX-2 and TGF- β , which allows us to confirm the involvement of these proteins in prostatic cancer development in dogs.

1. INTRODUÇÃO

As afecções prostáticas representam um problema freqüente em cães adultos e idosos (OLSON et al., 1987; KRAWIEC, 1994; DORFMAN E BARSANTI, 1995). As lesões prostáticas mais comuns em cães incluem a hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatites, cistos prostáticos e o adenocarcinoma (JOHNSTON et al., 2000).

Em estudo retrospectivo realizado com cães, Teske et al. (2002) observaram 57,1% de HPB, 19,3% de prostatites e 13% de carcinomas prostáticos. Os autores relatam que o percentual real de HPB pode ser maior do que o observado, pois não foram incluídos animais que não apresentassem sintomatologia de doença prostática, fato comum em cães com hiperplasia. Ressaltam ainda que a HPB esteja presente em 100% das próstatas de animais acima de seis anos.

Se as hiperplasias fossem precursoras das lesões neoplásicas, provavelmente a incidência desta última afecção seria maior, já que 80 a 100% dos cães acima de cinco anos de idade apresentam HPB (LAUFER AMORIM, 2001).

Neoplasia intra-epitelial prostática canina (PIN) é considerada uma lesão pré-neoplásica no cão e 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. Segundo Rossignol et al. (2004) a PIN ou displasia de alto grau é a única lesão que, no homem, é considerada precursora do câncer prostático.

Uma outra lesão que, recentemente vem sendo estudada nos homens é a atrofia prostática associada a infiltrado inflamatório. Esta afecção também é considerada precursora do adenocarcinoma prostático e ocorre associado a inflamações crônicas. Por esta razão, o termo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) foi introduzido (DE MARZO et al., 2003).

Visto a alta incidência de HPB no cão e a baixa freqüência de neoplasias, o estudo de lesões pré-neoplásicas é de fundamental importância para o entendimento do desenvolvimento do câncer prostático nesta espécie. No presente trabalho marcadores imunoistoquímicos, como a cicloxigenase-2

(COX-2) e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), foram utilizados uma vez que estas proteínas se relacionam à angiogênese, inibição da apoptose, aumento da capacidade invasiva, metástases e modulação da inflamação nas diferentes afecções prostáticas. Sendo assim este estudo objetiva:

- Avaliar e quantificar a imunomarcacão da cicloxigenase-2 nas próstatas normais, hiperplásicas, com neoplasia intra-epitelial prostática, atrofia inflamatória proliferativa e carcinoma prostático;
- Comparar a intensidade de marcação da cicloxigenase-2 nas diferentes alterações prostáticas;
- Avaliar e quantificar a imunomarcacão do TGF β nas próstatas normais, hiperplásicas, com neoplasia intra-epitelial prostática atrofia inflamatória proliferativa e carcinoma prostático;
- Comparar a intensidade de marcação do TGF β nas diferentes alterações prostáticas;
- Correlacionar a imunomarcacão de COX-2 e TGF β nas diferentes afecções prostáticas do cão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia e fisiologia prostática

A próstata é um órgão músculo-glandular e tem como principal função a produção do fluido prostático que transporta e sustenta os espermatozóides no processo de ejaculação (BENOIT et al., 1993; SWINNEY, 1998). No cão é dividida em dois lobos por um septo medial de tecido fibroso e, ao centro da glândula está presente a uretra prostática (JOHNSTON et al., 2001).

Microscopicamente, a próstata canina é dividida em lóbulos, sustentados pelo estroma, e envolta por uma espessa cápsula fibromuscular. Tais lóbulos são constituídos de glândulas túbulo-alveolares compostas que se estendem a partir de sua abertura no ducto uretral. Os ductos prostáticos, nos quais o fluido desemboca não coalescem, ao invés disso abrem-se no interior da uretra proximal, ao redor dos orifícios dos ductilos deferentes, formando o colículo seminal (JOHNSTON et al., 2001).

As células glandulares são cúbicas a colunares e apresentam-se normalmente em dupla camada, composta de epitélio secretor e basal, este último localizado ao longo da membrana basal. Nos ductos excretores o epitélio torna-se do tipo transicional. O estroma prostático consiste de fibroblastos e células musculares lisas envoltos por colágeno, com vasos sanguíneos e nervos (Figura 1) (OLSON et al., 1987; BARSANTI & FINCO, 1992; DORFMAN & BARSANTI, 1995).

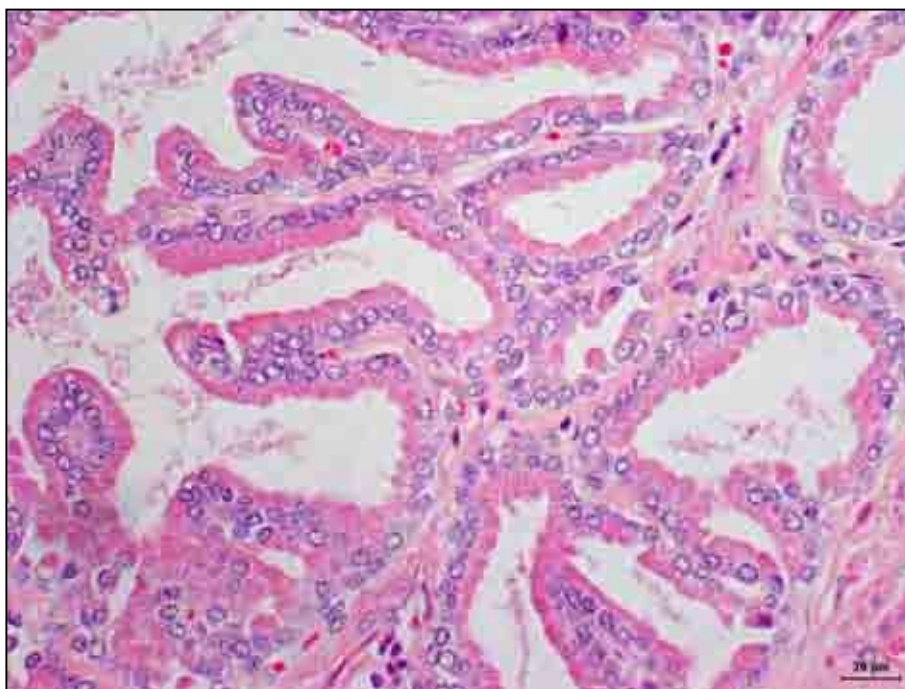


FIGURA 1 – Próstata normal de cão. Nota-se epitélio secretor (seta preta), estroma de sustentação (seta vermelha) e lúmen glandular (asterisco). HE. (Di Santis, 2006)

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente, uma vez que a castração do animal gera atrofia do tecido glandular e a presença e/ou variação nos níveis desses hormônios leva ao aumento gradual da glândula, por proliferação de elementos epiteliais e estromais (ROGERS et al., 1986; CHEW, 1997; PURSWELL et al., 2000). O crescimento prostático e a secreção do fluido são mediados pela ação da dehidrotestosterona (DHT), um metabólito da testosterona formado na presença da enzima 5 α -redutase das células estromais (JOHNSTON et al., 2001).

A interação estroma-epitélio apresenta papel fundamental na modulação da organogênese embriogênica e na manutenção da estrutura e funções da glândula (LEAV et al., 1997), além de representar uma importante etapa no desenvolvimento da hiperplasia e do câncer prostático (HELLSTROM et al., 1997).

Com o avançar da idade, a próstata aumenta seu volume concomitantemente com a elevação da testosterona sérica e, após a maturidade sexual, permanece neste tamanho até o desenvolvimento da

hiperplasia prostática benigna (HPB) ou qualquer outro processo patológico benigno ou maligno que leve à expansão da glândula (ISAACS, 1984; BARSANTI & FINCO, 1992). Ocorre uma diminuição do volume da próstata canina em 50% após três semanas de castração, e em 70% após nove semanas de castração (JOHNSTON et al., 2001).

2.2. Afecções prostáticas

O crescimento prostático, as alterações morfológicas referentes à idade e o envolvimento hormonal na patogenia das lesões prostáticas vêm sendo cada vez mais estudados nos cães devido às semelhanças dos processos entre as espécies canina e humana (LOWSETH et al., 1990; DORFMAN & BARSANTI, 1995).

Cães sexualmente intactos são mais suscetíveis a doenças prostáticas do que os castrados, porém em relação ao adenocarcinoma esta afirmação não é válida, uma vez que sua ocorrência não é menor em animais castrados (KRAWIEC & HEFLIN, 1992).

Burk & Ackerman (1996) referem a HPB como a causa mais comum de aumento de volume prostático no cão. De acordo com estes autores, outras alterações como neoplasias, cistos e prostatites culminam com a prostatomegalia.

O componente estromal contribui para a patogênese da HPB alterando a diferenciação das células epiteliais (KLAUSNER et al., 1994). Fatores de crescimento derivados do estroma, como o TGF- β e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), se acumulam e contribuem para a progressão da HPB (NIU et al., 2001).

Somente o homem e o cão são propensos ao desenvolvimento espontâneo de HPB e adenocarcinoma prostático. A incidência de HPB é igualmente alta entre estas espécies, mas o câncer é mais comum no homem (DE MARZO et al., 1999).

O câncer prostático do cão é similar ao dos humanos no que tange à idade ao diagnóstico, associação com neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau e propensão à metástase no esqueleto. O Quadro 1

apresenta alguns aspectos importantes do câncer prostático canino espontâneo em comparação com os humanos (BOSTWICK et al., 2000).

QUADRO 1: Aspectos semelhantes entre o carcinoma prostático canino e o carcinoma prostático humano

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Em materiais de necropsias, frequentemente são observados PIN e câncer• PIN é um passo intermediário entre o epitélio normal e o carcinoma invasivo• Semelhanças na expressão de marcadores na PIN e no câncer (microdensidade vascular, Ki-67, PCNA)• Câncer é andrógeno-independente• Metástases ósseas |
|---|

(BOSTWICK et al., 2000)

Para Bonkhoff et al. (1999) o adenocarcinoma prostático em cães apresenta etiologia considerada espontânea, mas não há dúvidas quanto ao envolvimento hormonal. Swinney (1998) sugere duas possibilidades etiológicas para a neoplasia prostática em cães orquiectomizados: 1) as células envolvidas no tumor são hormônio-independentes e 2) as neoplasias sofrem influências de hormônios extratesticulares.

A lesão pré-neoplásica no cão, neoplasia intra-epitelial canina (PIN) foi descrita em 1997 por Waters & Bostwick e seu diagnóstico é definido por analogia com a descrição de alterações celulares dos humanos feita por McNeal & Bostwick, 1986. A PIN ou displasia de alto grau é a única lesão que, no homem, é considerada precursora do câncer prostático (ROSSIGNOL et al., 2004).

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 PIN como proposto por Bostwick & Brawer em 1987 e endossado em 1989 (DRAGO et al., 1989).

Crítérios morfológicos foram estabelecidos por McNeal e Bostwick para o diagnóstico desta lesão e, três graus foram identificados de acordo com o Quadro 2 (BOSTWICK & BRAWER, 1987):

QUADRO 2: Critérios de graduação para neoplasia prostática intra-epitelial

		Características citológicas			Características associadas	
	Características arquiteturais	Núcleo	Cromatina	Nucléolo	Camada de células basais	Membrana basal
PIN 1	Células epiteliais empilhadas, estratificadas e irregularidade de espaço	Variação e aumento de tamanho	Normal	Infrequente	Intacta	Intacta
PIN 2	Semelhante ao PIN 1, porém com mais empilhamento e estratificação celular	Variação e aumento de tamanho mais pronunciados	Aumentada	Ocasionalmente evidente e grande	Intacta	Intacta
PIN 3	Semelhante ao PIN 2 com formação de pontes	Variação e aumento de tamanho mais pronunciados	Aumento acentuado	Frequentemente grande (semelhante ao carcinoma)	Pode apresentar ruptura	Pode apresentar ruptura

(BOSTWICK & BRAWER, 1987)

Uma nova graduação foi proposta em 1989, onde o PIN foi dividido em dois grupos. O PIN de baixo grau (LGPIN), correspondente ao PIN 1 e o PIN de alto grau (HGPIN), onde os graus 2 e 3 foram agrupados (BOSTWICK, 1995).

Microscopicamente, a neoplasia intra-epitelial prostática dos humanos consiste de alterações cito-histológicas no interior de ductos ou ácinos pré-existent, geralmente multifocais. A LGPIN caracteriza-se por ductos ou ácinos contendo epitélio hiper celular, condensado e irregular, com marcada variação do tamanho nuclear. Núcleos alongados, hipercromáticos e

pequenos nucléolos podem estar presentes. A HGPIN se diferencia da LGPIN pela alta celularidade e a estratificação celular mais evidentes, além da variação do volume nuclear entre as células é menor, pois a maioria possui núcleo aumentado. A presença de nucléolo proeminente, freqüentemente múltiplo, é típica na HGPIN e de grande utilidade diagnóstica. Quatro padrões arquiteturais podem ser observados na HGPIN: sólido, micropapilar, cribiforme e plano (BOSTWICK, 1997).

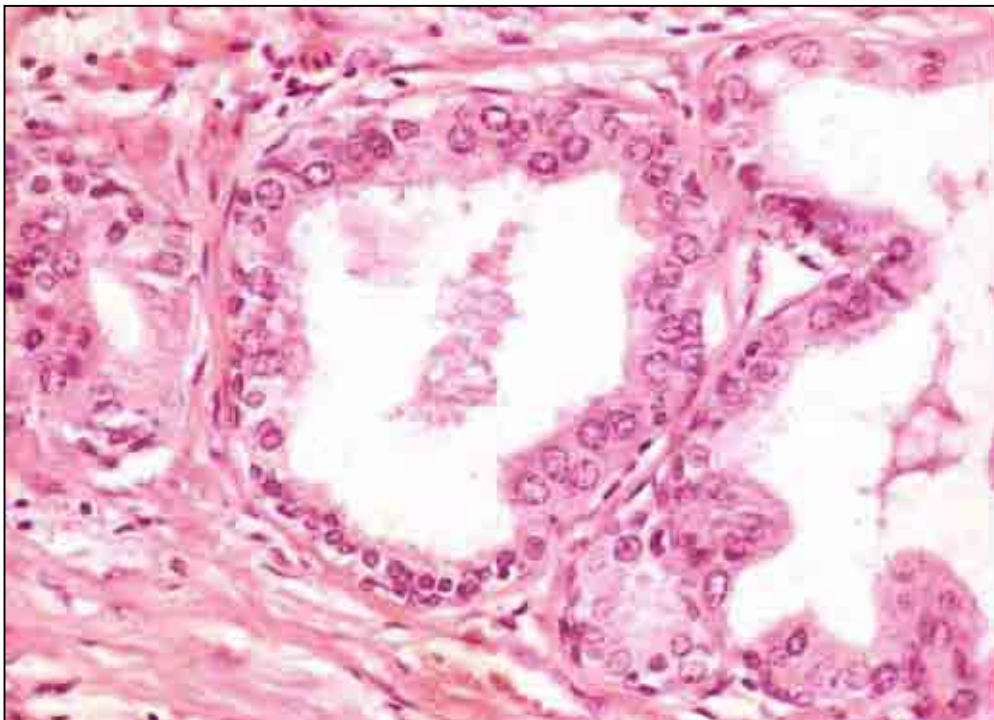


FIGURA 2 – Próstata humana com PIN. Observar transição entre o epitélio normal constituído por células cilíndricas baixas e o epitélio atípico constituído por núcleos muito volumosos e irregularmente dispostos (BILLIS, 2003).

Os aspectos morfológicos que incluem ruptura da camada de células basais, aumento da capacidade proliferativa e da densidade microvascular, sugerem que o HGPIN é um estágio intermediário de progressão do epitélio benigno à carcinoma (WATERS & BOSTWICK, 1997b).

Mudanças significativas na expressão de oncogenes, fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento ocorrem na transição do epitélio benigno a PIN, ressaltando que tal lesão representa passo importante no processo da carcinogênese (WATERS & BOSTWICK, 1997a).

O risco de se encontrar carcinoma em uma biopsia seqüencial é de 27 a 100% em estudos de biopsia prostática de homens com suspeita clínica de câncer prostático com focos de HGPIIN. Por outro lado, o risco de se obter neoplasia em biopsias seqüenciais em homens com LGPIIN é semelhante aos pacientes sem PIN (FENELEY & BUSCH, 1997).

Os primeiros dados na literatura mencionando HGPIIN em cães descrevem a presença desta lesão em 19 (66%) de 29 glândulas com diagnóstico prévio de adenocarcinoma. As HGPIIN mostraram características citológicas idênticas aos humanos incluindo hipercelularidade, perda da polaridade e aumento nuclear e nucleolar (WATERS et al., 1997).

Waters e Bostwick (1997a) utilizaram 35 cães sem evidências clínicas de doenças prostáticas para avaliar a incidência de HGPIIN 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 HGPIIN 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 HGPIIN no cão, assim como no homem, é influenciada pela idade e por hormônios androgênicos testiculares.

Rossignol et al. (2004) estudaram 22 próstatas de cães acima de 7 anos de idade e não castrados. O diagnóstico de PIN e adenocarcinoma foi fundamentado em descrições de MOLINE (2001), sendo utilizados os anticorpos Ki-67 (MIB-1) e 34 β E12 a fim de auxiliar a caracterização das lesões. Nenhum caso de PIN de alto grau foi observado e quatro animais apresentaram PIN de baixo grau. Neoplasia não foi diagnosticada e dois casos suspeitos foram classificados como atrofia, após imunoistoquímica com 34 β E12.

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

Billis (2003) emprega a denominação de PIN para as lesões atípicas do epitélio de revestimento dos ductos e ácinos com potencial de serem precursores do carcinoma invasivo. A lesão já foi denominada de proliferação atípica, hiperplasia atípica, lesões displásicas, displasia intra-ductal entre outros.

Segundo Helpap (1998), em humanos, o mecanismo de proliferação e diferenciação celular está alterado na PIN, pois são observadas células basais diferenciadas atipicamente, com potencial proliferativo, migrando para o compartimento secretor, enquanto no tecido normal ou hiperplásico a capacidade proliferativa é restrita à camada basal. Com esta progressiva indiferenciação celular, tende a ocorrer também a perda gradativa das células basais, facilitando a extensão da lesão para o estroma e sua transformação em carcinoma invasivo (ALGABA, 1997).

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

A atrofia prostática em humanos é identificada com redução do volume glandular e estromal e pode ser dividida em dois grandes grupos: difusa e focal. A difusa resulta da diminuição de andrógenos circulantes, enquanto que a focal não apresenta esta relação. A atrofia focal ocorre na zona periférica da próstata, local onde se observam os carcinomas, e está relacionada com infiltrado inflamatório mononuclear (DE MARZO et al., 1999; DE MARZO et al., 2003).

Desta forma, 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).

De Marzo et al. (1999) propuseram o termo atrofia inflamatória proliferativa para designar foco de proliferação glandular epitelial com

aparência morfológica de uma atrofia simples ou hiperplasia pós-atrófica, ocorrendo em associação com inflamação.

Utilizando marcadores imuinostiquímicos para proliferação (Ki-67) e apoptose (bcl-2), Ruska et al. (1998) compararam o epitélio benigno não atrófico à atrofia prostática focal. Demonstraram alta taxa proliferativa nesta lesão e diminuição do índice apoptótico por aumento da expressão de bcl-2.

Estudos em humanos, caracterizando a PIA, demonstram um aumento na imunomarcagem utilizando-se o anticorpo anti-Ki-67, o que representa uma alta taxa proliferativa e diminuição do índice apoptótico (FAITH et al, 2005; SUGAR, 2006; TOMAS et al., 2006).

Existem hipóteses que confirmam a PIA como precursora do PIN, dentre elas a alta taxa proliferativa em ambas as lesões, semelhanças fenotípicas nas células secretórias imaturas e localização na zona periférica na PIA, PIN e HGPIN (DE MARZO et al., 1999).

A lesão ocorre em áreas adjacentes a HGPIN e/ou câncer e apresenta anormalidades genéticas semelhantes (SUGAR, 2006). A PIA pode progredir para HGPIN e, subsequente para carcinoma prostático. Investigações sobre frequência, distribuição, índice proliferativo e mudanças genéticas na PIA sugerem a sua relação com o HGPIN e o câncer prostático (TOMAS et al., 2006).

Em modelos de roedores a atrofia prostática focal acompanhada de inflamação tem sido proposta no desenvolvimento de câncer prostático (PALAPATTU et al., 2004).

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).

A relação entre a inflamação e o câncer prostático é sugestiva e não definitiva. Estudos utilizando a administração de anti-inflamatórios não esteróides (AINES) demonstraram redução do risco de carcinoma e/ou metástases (DE MARZO et al., 2003).

O papel da inflamação no carcinoma prostático e sua possibilidade de controle com o uso de AINES estão relacionados à cicloxigenase, particularmente a cicloxigenase-2, que também apresenta relação com o desenvolvimento de câncer (DE MARZO et al., 2003).

2.3. Cicloxigenase-2 e fator de crescimento transformador- β

A COX-2 apresenta papel fundamental na resposta inflamatória e, acredita-se que a inflamação tenha relação com o desenvolvimento do câncer prostático, quando se detecta a associação entre variantes genéticas da COX-2 e o risco de neoplasia (SHAHEDI et al., 2006).

Recentes estudos realizados relacionam a cicloxigenase-2 (COX-2) com o desenvolvimento e prevenção do câncer em outros tecidos (HUSSAIN, 2002). Esses dados sugerem um possível papel da cicloxigenase-2 no processo de progressão da lesão pré-neoplásica ou neoplasia benigna em neoplasia maligna, além de induzir uma variedade de estímulos mitogênicos e inflamatórios (BAKHLE, 2001; KULKARNI et al., 2001; PATEL et al., 2005).

Com relação à expressão em células do epitélio prostático normal e no carcinoma, apenas a COX-2 mostra-se significativa, enquanto que não existe diferença na expressão de COX-1 (KIRSCHENBAUM et al., 2001). A COX-2 é claramente expressa em focos de PIN e no estroma da HPB estromal. Em contraste a estes dados, Hussaim (2002) demonstrou que não há imunomarcção expressiva de COX-2 em adenocarcinoma e PIN, comparando-se ao epitélio normal. A marcação é vista em células normais e neoplásicas que estão dispersas, porém muito mais consistente em áreas de atrofia inflamatória proliferativa.

Marcações imunoistoquímicas em tecidos prostáticos humanos com a COX-2 demonstram que, em glândulas sem neoplasia, a expressão limita-se a musculatura lisa e algumas células basais e as células luminais nestas glândulas não expressam esta enzima, porém são positivas quando encontradas em áreas que existam focos inflamatórios (KIRSCHENBAUM et al., 2001).

Estudos em humanos têm avaliado a expressão da COX-2 em câncer prostático, porém com resultados conflitantes. Gupta e colaboradores (2000) sugerem uma elevada expressão nos carcinomas, enquanto que, Zha e colaboradores (2001) demonstraram que níveis de COX-2 são extremamente baixos ou ausentes na maioria das neoplasias prostáticas.

Segundo Shahedi et al. (2006), a expressão de COX-2 é elevada em tecidos prostáticos neoplásicos comparando-se aos tecidos normais. *In vitro*, a expressão desta enzima inibe a apoptose e estimula a angiogênese tumoral.

Kamijo e colaboradores (2001) sugerem que a COX-2 representa uma importante etapa no desenvolvimento do câncer prostático e que inibidores da COX-2 suprimem o crescimento da neoplasia e que não tem efeito sobre células estromais de próstatas normais. Portanto, estes podem ser utilizados no tratamento do câncer prostático.

A supressão da expressão da COX-2 com o uso de AINES seletivos está associada à alta taxa apoptótica e redução do crescimento tumoral e da neovascularização (MUKHERJEE, 2005; NARAYANAN et al., 2006).

O TGF- β é um regulador geral das atividades celulares com múltiplos efeitos biológicos, cuja identificação permite entender os mecanismos pelos quais as funções celulares estão reguladas em células normais e alteradas. É assim denominado por sua função de induzir a transformação e inibir a proliferação de fibroblastos normais (PERALTA-ZARAGOZA, 2001). Além de suprimir a proliferação tecidual, o TGF- β induz a apoptose (MA et al., 2005).

O TGF- β apresenta funções na regulação da proliferação e diferenciação celular, estimula a síntese de matriz extra-celular, modula a migração celular, induz a angiogênese, além de ser imunomoduladora.

É um potente estimulador da fibrose e controla a expressão de muitas proteínas, incluindo colágeno (tipos I, II e IV), fibronectinas, tromboespondina e proteoglicanos (VERCELLI et al., 2003). Além de ser quimiotático para fibroblastos e estimular o crescimento de fibroblastos imaturos (REIS et al., 2000).

As células prostáticas, em humanos, expressam as três isoformas de TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), porém com predominância na expressão de TGF- β 1. Em baixas concentrações promove a proliferação das células estromais prostáticas, enquanto que em altas concentrações inibe a proliferação destas células. Estas observações permitem incluir o TGF- β como um importante mediador do crescimento prostático (ZHOU et al., 2003).

A expressão do TGF- β pode ser observada em várias neoplasias. Estudos imunoistoquímicos revelam intensa marcação em tumores prostáticos quando comparados ao epitélio prostático normal, sugerindo que células epiteliais neoplásicas produzem e secretam TGF- β (WOLFF et al., 1998).

Sendo assim, as afecções prostáticas caninas são importantes não só pela sua elevada frequência nesta espécie, mas também por apresentar semelhanças morfológicas com as lesões prostáticas do homem, precisando-se melhor caracterizar biologicamente as lesões pré-neoplásicas no cão como a PIN e a PIA.

Além disso, marcadores imunoistoquímicos, como a COX-2 e o TGF- β auxiliam no entendimento da progressão das lesões proliferativas à câncer prostático, no intuito de se ter um diagnóstico seguro de focos neoplásicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção do material

O material foi selecionado de outras pesquisas com próstata canina realizadas no Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Botucatu, sendo separados cinco casos de cada um dos diagnósticos: normal, hiperplasias epitelial e estromal, PIN, PIA e neoplasia.

As próstatas eram coletadas de cães não castrados que vieram a óbito com ou sem história de afecção prostática e a necropsia realizada no máximo 24 horas após a morte do animal. A glândula era seccionada em três a seis porções, dependendo do tamanho da mesma.

Os diagnósticos de hiperplasia e carcinoma basearam-se em Jubb et al. (1993). O de PIN em Waters & Bostwick (1997) e o de PIA em De Marzo et al. (1999).

Os blocos de parafina foram então separados e, com o objetivo de avaliar a morfologia e reclassificar as lesões, foram confeccionados em micrótomo rotativo novos cortes histológicos em micrótomo com espessura de três µm, que foram colocados em estufa para desparafinizar e posteriormente corados pela coloração de Hematoxilina e eosina (HE).

A avaliação das lâminas, em microscópio óptico, foi realizada inicialmente em menor aumento (32X), seguindo-se para os aumentos subseqüentes (100x, 250x e 400x). O aumento de 32x auxiliou a visualização global do material, permitindo identificar áreas com diferentes padrões de lesão. Nos demais aumentos, foram avaliadas as estruturas estromal, epitelial e focos de displasia, sendo que o aumento de 400x foi utilizado para verificação de atipia nuclear, relação núcleo citoplasma e presença de figuras de mitose.

Os grupos foram divididos em:

- G I – próstatas normais;
- G IIA – hiperplasia prostática benigna epitelial;
- G IIB – hiperplasia prostática benigna estromal;
- G III – atrofia prostática inflamatória;
- G IV – neoplasia intra-epitelial prostática;
- G V – carcinoma prostático.

3.2. Imunoistoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram novamente cortados em micrótomo com espessura de três μm e distendidos em lâminas histológicas previamente preparadas com Organosilano (Sigma-Aldrich A3648) com o intuito de promover maior aderência dos cortes às lâminas, evitando a perda do material durante o procedimento imunoistoquímico. As lâminas foram estocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C por 24 horas, e transferidas para cubas de vidro vertical para iniciar a técnica de imunoistoquímica.

A técnica de imunoistoquímica seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu.

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

A recuperação antigênica pelo calor é a etapa que tem como objetivo a liberação dos epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol 10%).

Procedeu-se a recuperação antigênica na qual, para o anticorpo primário anti-COX-2 (Dako M3617, clone CX-294), padronizou-se a solução de citrato 10mM, pH 6,0 e, para o anticorpo primário anti-TGF β (Novocastra TGF β 17) padronizou-se a solução de EDTA 10mM, pH8,0, soluções estas pré-

aquecidas em banho-Maria à 96°C. Após o pré-aquecimento a lâminas foram introduzidas na solução e mantidas por 25 minutos (Anexo A).

Após o resfriamento do material seguiu-se com dez lavagens em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10 volumes por 20 minutos e em seguida, lavou-se o material em água destilada e posteriormente em solução tampão de TRIS HCl (Trizma base, Sigma, T1503; NaOH P.A Merck, 106404.1000) por 10 minutos em duas trocas de cinco minutos cada.

As lâminas foram retiradas das cubas de vidro e foram depositadas em câmara úmida para incubação com BSA 1% (Albumina sérica bovina – Sigma A7906) durante uma hora em temperatura ambiente. Este procedimento tem a finalidade de reduzir as marcações inespecíficas (“fundo”).

O excesso de BSA 1% foi retirado e procedeu-se a incubação com os anticorpos primários monoclonais de acordo com a Tabela 1, em câmara úmida por 18 horas (“over-night”) à 4°C.

TABELA 1: Anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, marca e diluições padronizadas.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Tipo de marcação</i>	<i>Clone</i>	<i>Marca</i>	<i>Diluição padronizada</i>
COX-2	citoplasmática	CX-294	Dako	1:50
TGF-β	citoplasmática	17	Novocastra	1:50

Após este período, as lâminas foram lavadas em TRIS (dois banhos de cinco minutos) para iniciar a próxima etapa.

Para incubação do anticorpo secundário foram utilizados protocolos distintos para as lâminas incubadas com COX-2 e TGF- β .

Nas lâminas incubadas com o anticorpo primário anti-TGF- β , utilizou-se o kit LSAB (Dako K0690) que, segundo recomendações do fabricante, permanece 30 minutos na solução de anticorpo secundário biotinizado e em seguida, mais 30 minutos na streptoavidina-peroxidase em câmara úmida a temperatura ambiente.

Para as lâminas incubadas com o anticorpo primário anti-COX-2, o processo de incubação com o anticorpo secundário foi utilizado o Kit Envision (Dako K4065) durante uma hora em temperatura ambiente.

Após incubação as lâminas foram lavadas em solução tampão de TRIS por cinco minutos.

Para a revelação da reação foi empregada solução pronta para uso de DAB, seguindo as recomendações do fabricante (Dako K34466) por cinco minutos, em seguida lavou-se o material em TRIS e água destilada, procedendo-se a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

Foi realizada nova lavagem em água corrente por 10 minutos e passagem em bateria de desidratação com álcoois 85%, 95% e absolutos. As lâminas foram montadas (Permunt – Fischer Scientific –SP 15-500) com lamínulas e levadas ao microscópio para avaliação da imunomarcação.

Nas baterias de imunoistoquímica foi feita processada uma lâmina de controle negativo onde foi suprimido o anticorpo primário na incubação, e substituído por BSA 1% e imunoglobulinas de camundongo (Dako, X0903).

As análises imunoistoquímicas de COX-2 e TGF- β foram realizadas avaliando a intensidade de marcação e percentual de células marcadas em toda extensão da lâmina, em aumento de 40x com auxílio do programa de análise de imagens QWin v3,0 Leica e uma câmera digital Leica DFC acoplada a um microscópio Leica DMLD. Procedeu-se a captura dos campos e as avaliações foram feitas como descrito a seguir.

Para a avaliação tanto da intensidade quanto o percentual de positividade foram considerados os campos com o grupo diagnóstico atribuído, como por exemplo, focos de PIN foram estudados isoladamente, independente de outras lesões prostáticas.

Sendo assim, para algumas afecções, foi considerado um campo com lesão e não toda a lâmina que poderia apresentar outra lesão concomitantemente.

Com relação a intensidade de marcação os escores foram atribuídos da seguinte forma: – (sem marcação), + (fraca), ++ (moderada) e +++ (forte) foram utilizados para a análise, enquanto que o percentual de positividade utilizou-se os escores **0**: sem marcação; **1**: 1 - 25%; **2**: 26 – 50%; **3**: 51 – 75% e **4**: >76%.

Os dados obtidos das avaliações imunoistoquímicas (intensidade de marcação e percentual de positividade) para cada anticorpo foram separados de acordo com cada grupo de lesão prostática avaliada.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação histológica

A seleção dos cinco casos de cada grupo fundamentou-se nos critérios descritos a seguir.

A próstata normal (G1) foi caracterizada pela presença de lóbulos constituídos de glândulas que apresentavam células cúbicas a colunares e epitélio basal, além de estroma composto por fibroblastos e células da musculatura lisa (Figura 3).

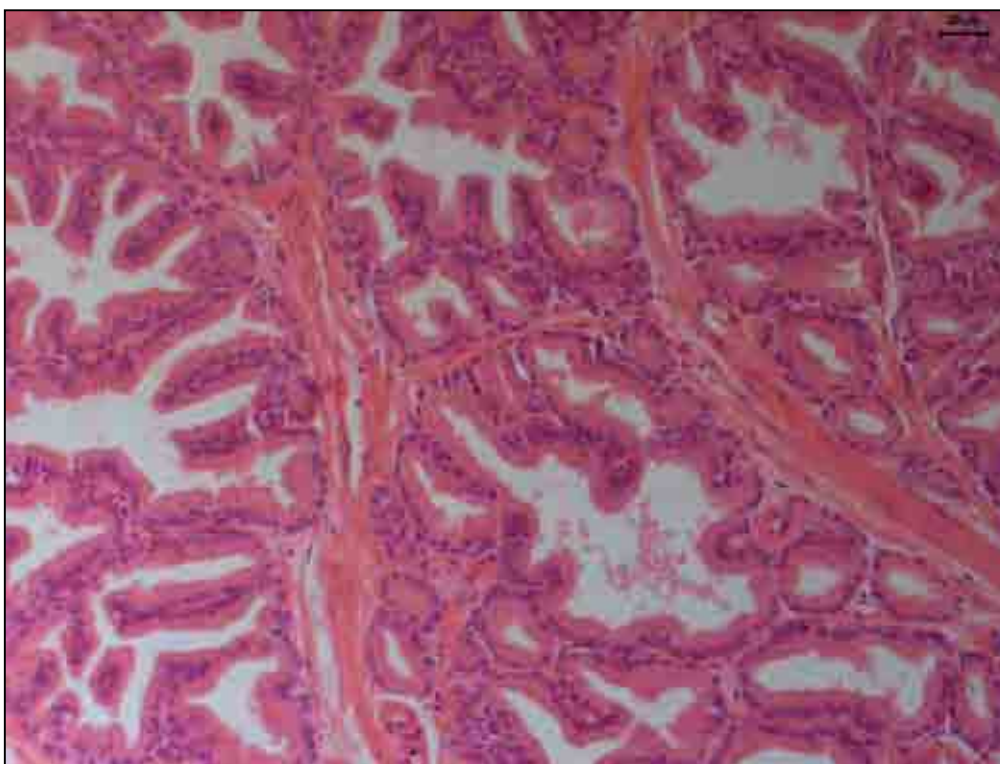


FIGURA 3 – Próstata normal. Observar epitélio e estroma. HE

A hiperplasia epitelial (GIIA) se caracterizou por proliferação do epitélio acinar sob forma de projeções papilares para o interior do lúmen, cobertas por uma ou duas camadas de células epiteliais, estas denominadas hiperplasia epitelial papilífera (Figura 4). Quando grandes ácinos glandulares dilatados, irregulares e revestidos por epitélio cúbico achatado, com ou sem secreção luminal foram observados, eram denominadas hiperplasia epitelial cística (Figura 5).

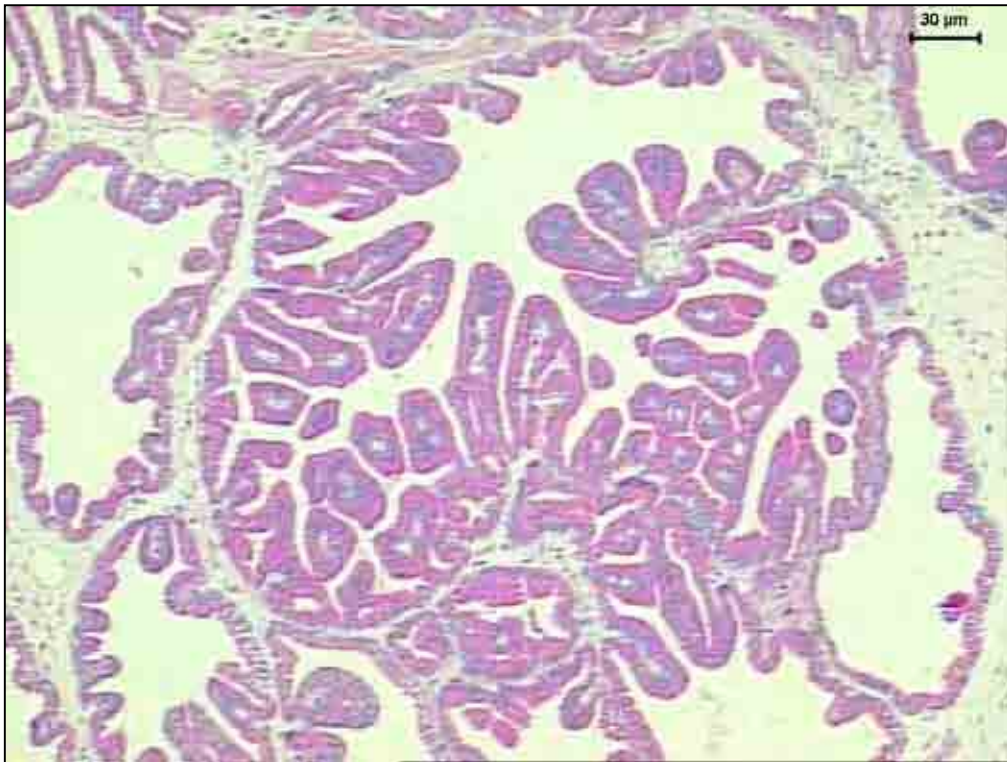


FIGURA 4 – Hiperplasia prostática epitelial papilífera. Observar projeções digitiformes para o interior do lúmen. HE.

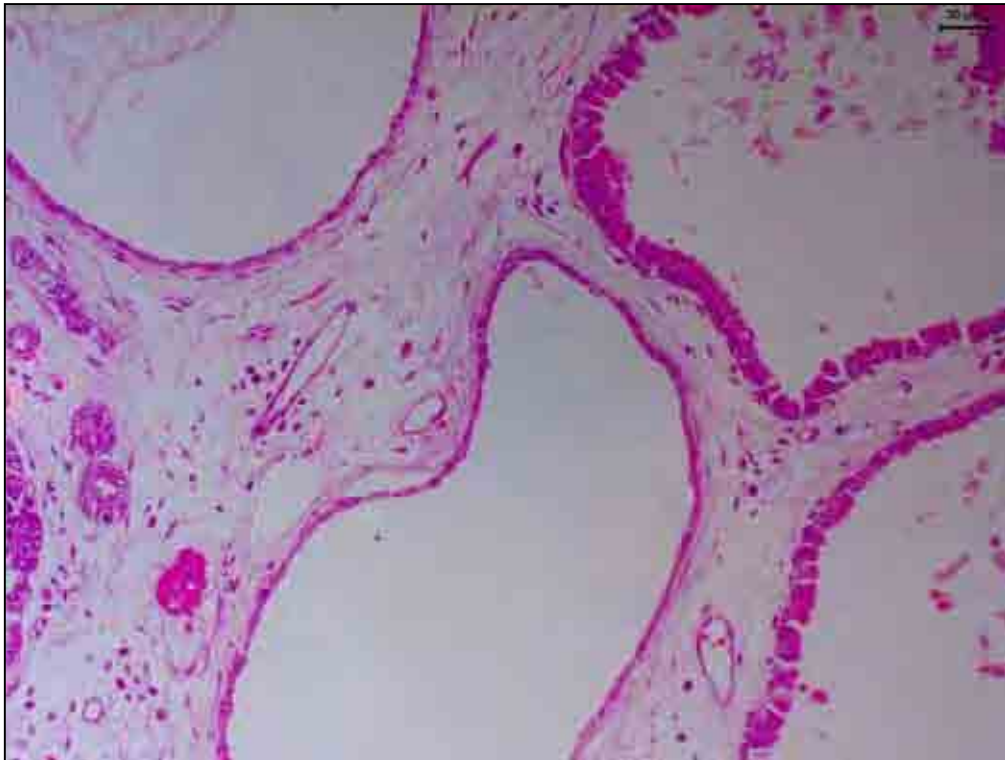


FIGURA 5 – Hiperplasia prostática epitelial cística. Ácinos dilatados e irregulares. Dilatações císticas recobertas por epitélio achatado. HE.

A hiperplasia estromal distinguiu-se pela proliferação do estroma fibroso, muscular ou ambos, associado ou não a atrofia glandular e infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 6).

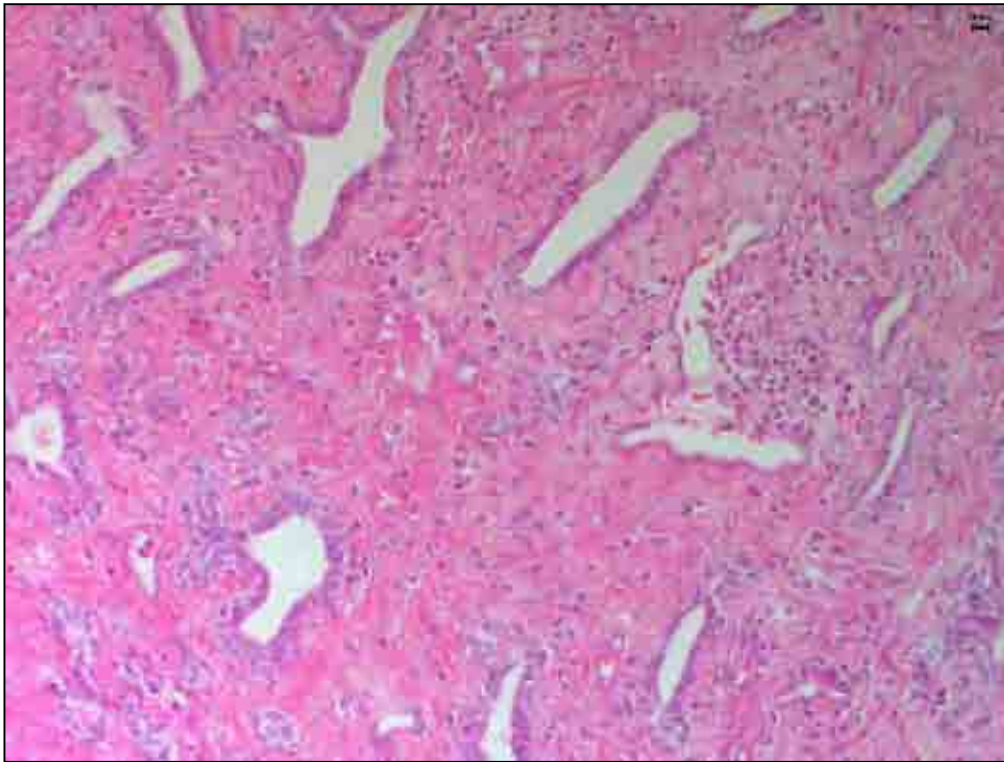


FIGURA 6 – Hiperplasia prostática estromal. Observar aspecto fibroso e compacto associado à atrofia glandular e infiltrado inflamatório mononuclear. HE.

O grupo III, diagnosticado como PIA, caracterizava-se morfológicamente pela proliferação de células epiteliais glandulares que apresentavam atipias como núcleos volumosos, nucléolos evidentes em maior número (um a três) e citoplasma escasso, associadas a infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 7).

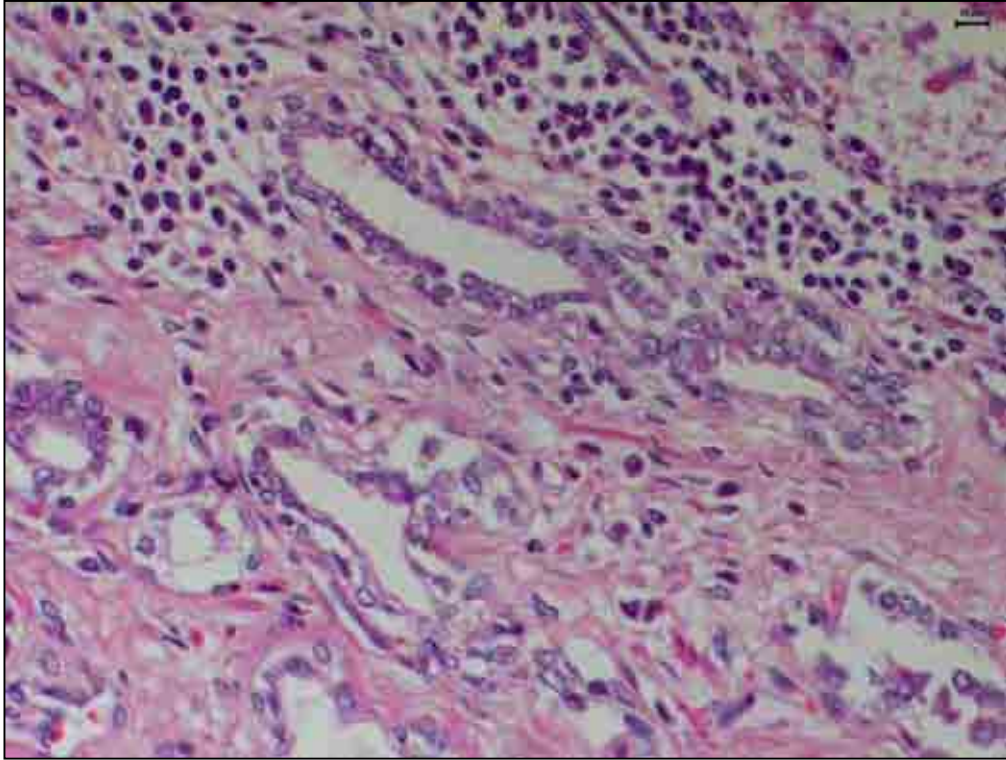


FIGURA 7 – Atrofia inflamatória proliferativa (PIA). Células epiteliais atípicas com evidência nucleolar associadas a infiltrado inflamatório mononuclear. HE.

O diagnóstico de PIN (GIV) baseou-se na hipercelularidade de áreas da glândula com células epiteliais empilhadas apresentando variação do tamanho nuclear e presença de nucléolos proeminentes em ácinos normais e sem associação com processo inflamatório (Figura 8).

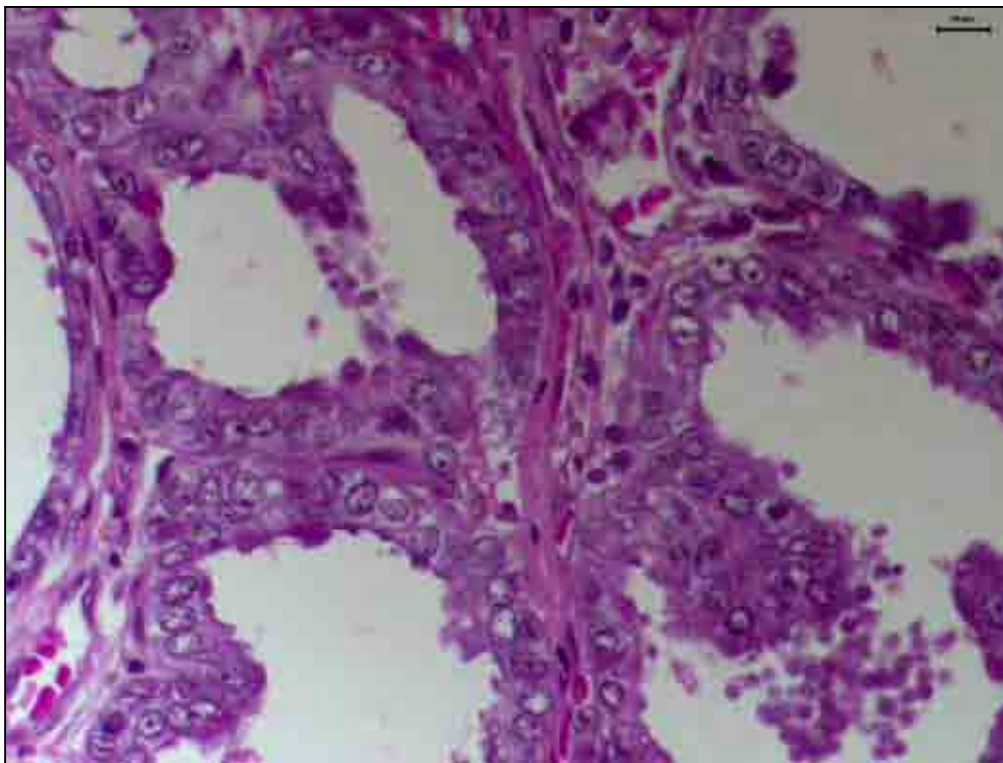


FIGURA 8 – Neoplasia intra-epitelial prostática (PIN). Empilhamento celular, variação do tamanho nuclear e nucléolos evidentes. HE.

As neoplasias prostáticas (GV) foram diagnosticadas pela presença de ácinos com forma ovalada, que infiltravam no estroma de forma multifocal. As células epiteliais apresentaram megacariose e nucléolos evidentes, sem diferenciação citoplasmática (Figura 9).

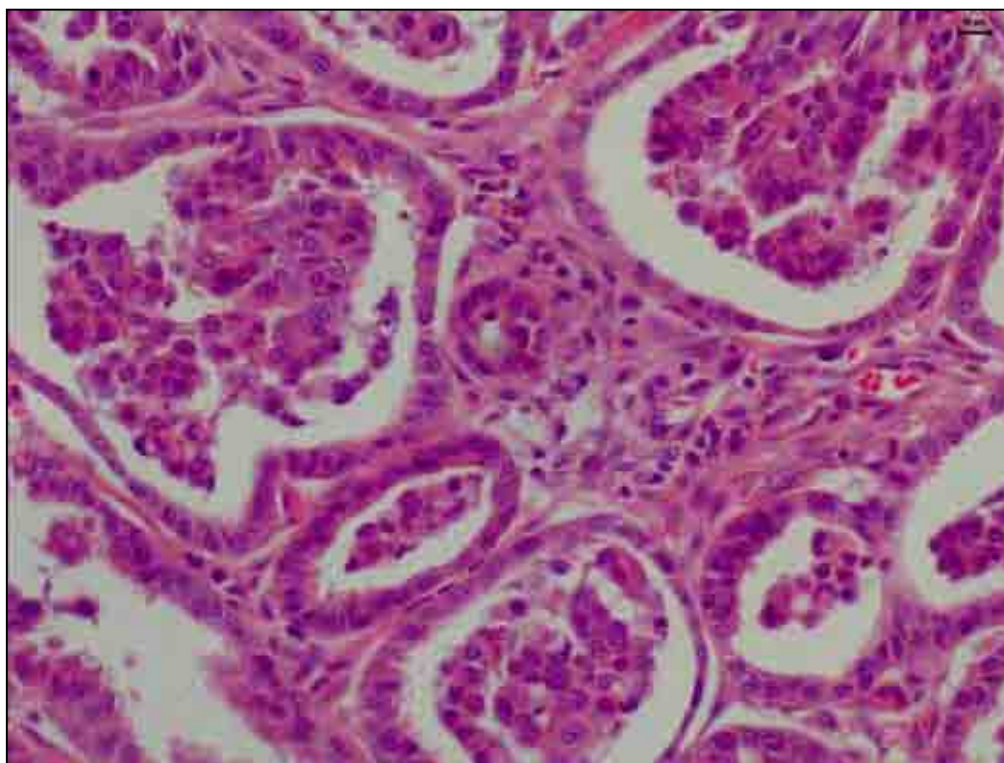


FIGURA 9 - Adenocarcinoma prostático. Ácinos compostos por células epiteliais atípicas com nucléolos evidentes e projeções papilíferas. HE.

4.2. Avaliação imunoistoquímica

A marcação para o anticorpo anti COX-2 foi citoplasmática variando de intensidade conforme tabela 2 (Figuras 10 a 15). Na próstata normal não se observou marcação nas células epiteliais, somente células inflamatórias foram marcadas, quando presentes. Na hiperplasia epitelial as células epiteliais foram fracamente positivas. Na hiperplasia estromal notou-se a imunomarcação nas células do estroma e ausência de marcação no epitélio. Neste grupo evidenciou-se maior infiltrado inflamatório mononuclear positivo para COX-2.

Os focos de PIA tinham o epitélio atrófico reativo para COX-2, bem como as células displásicas no GIV (PIN). No grupo carcinoma, a marcação citoplasmática variou com o grau de diferenciação da neoplasia, sendo mais intensa em dois casos, um deles metastático.

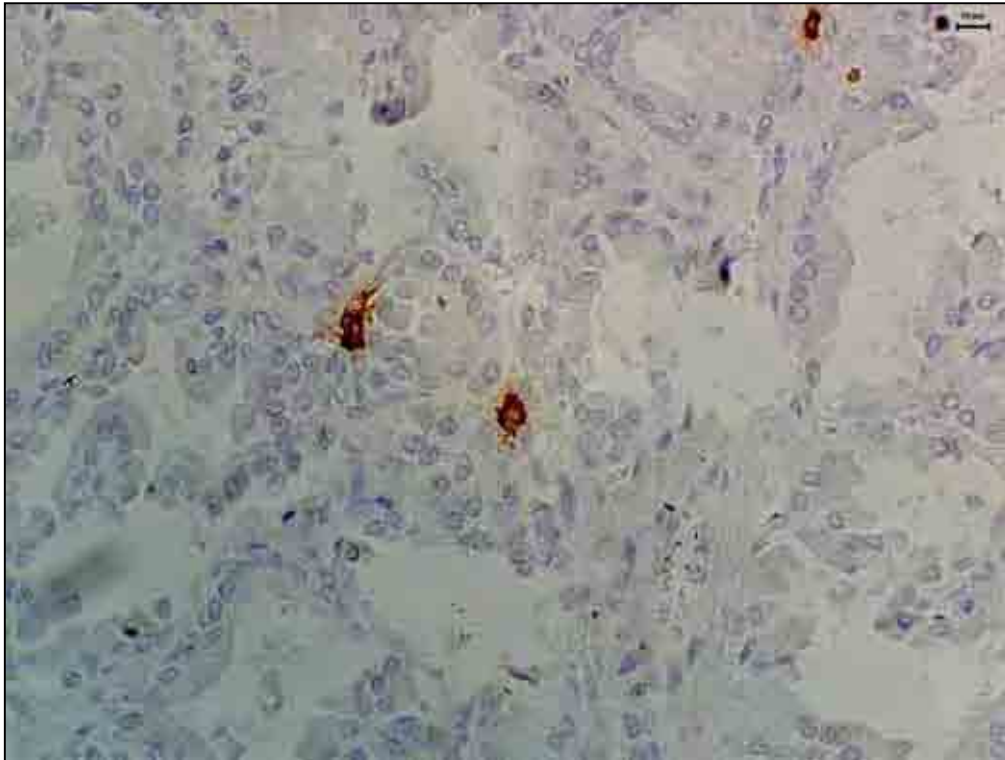


FIGURA 10 – Próstata normal. Imunomarcação positiva em células mononucleares. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

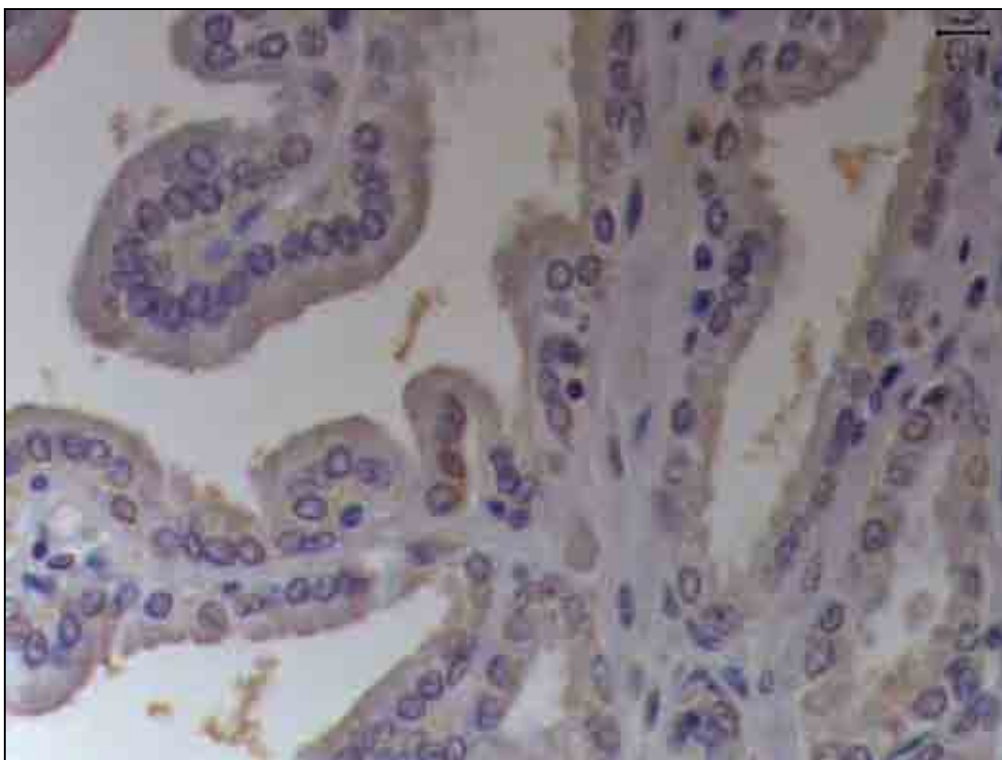


FIGURA 11 – Hiperplasia prostática epitelial. Discreta imunomarcação em células epiteliais. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

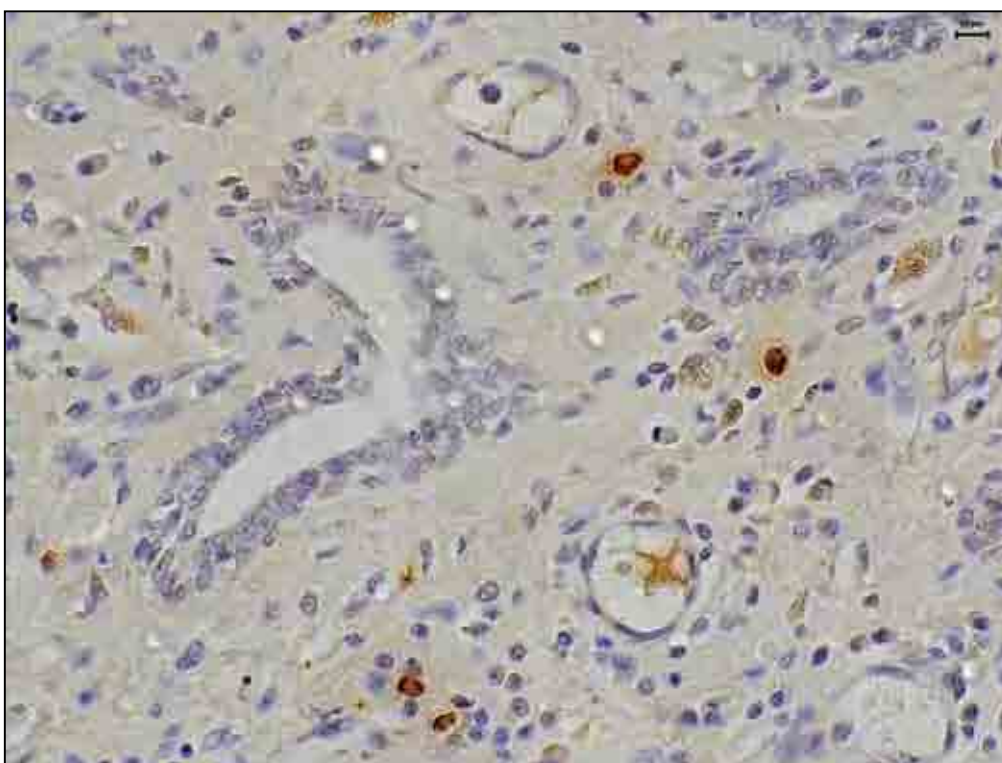


FIGURA 12 – Hiperplasia prostática estromal. Imunomarcação positiva estromal. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

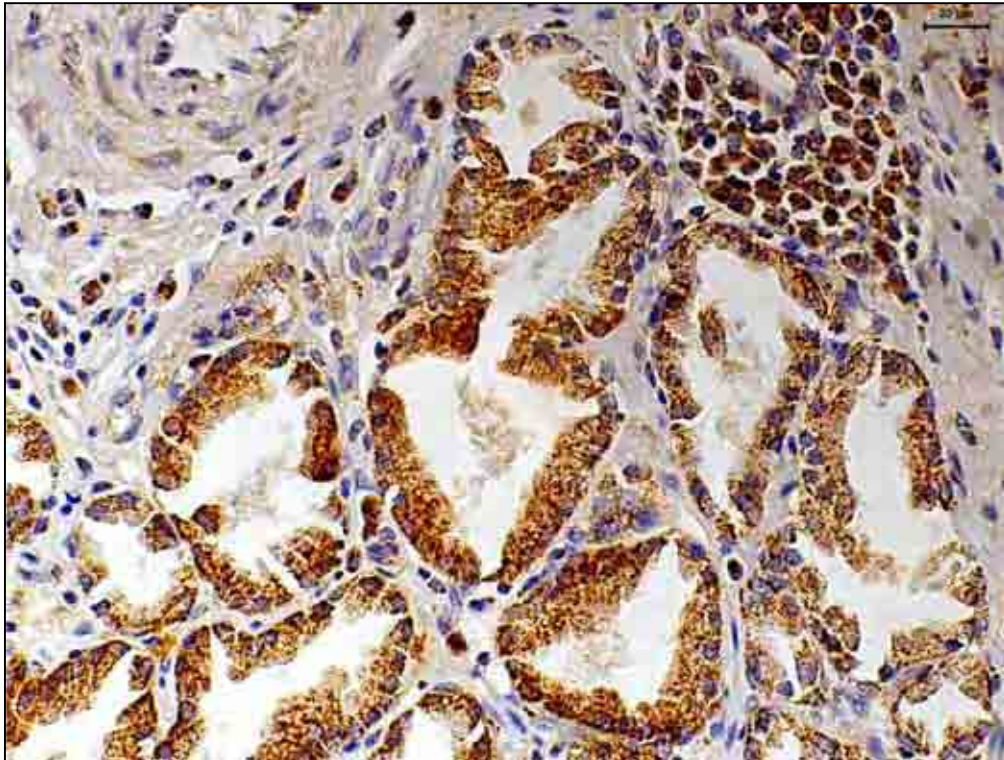


FIGURA 13 – Atrofia inflamatória proliferativa. Imunomarcacão em células epiteliais. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

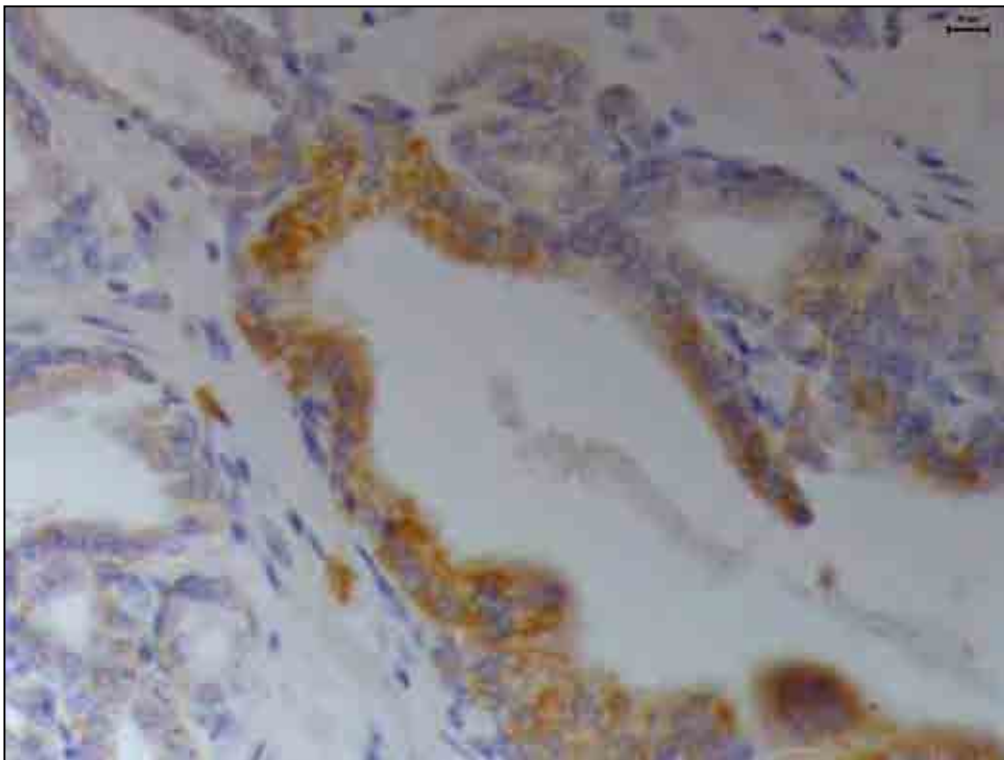


FIGURA 14 – Neoplasia intra-epitelial prostática. Imunomarcacão em células epiteliais displásicas. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

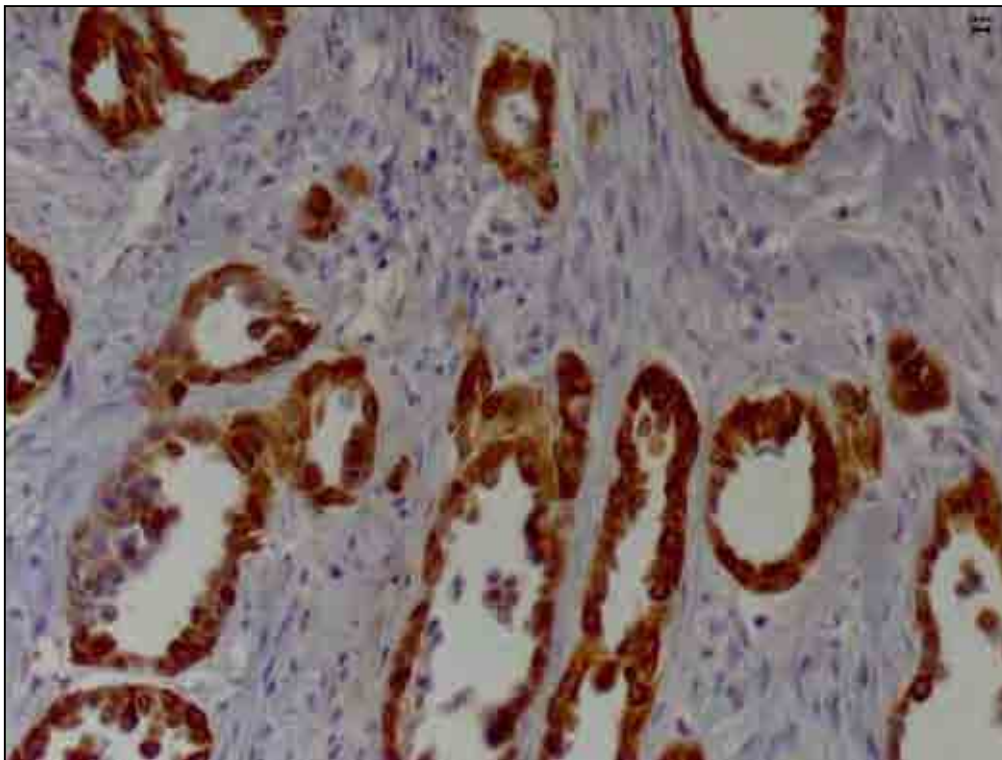


FIGURA 15 – Carcinoma prostático. Intensa marcação em células neoplásicas. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário COX-2, DAB, contra-coloração Hematoxilina.

A Tabela 2 e a Figura 16 representam os resultados das contagens de percentual de positividade e intensidade de marcação para o anticorpo anti COX-2.

TABELA 2 - Número de casos marcados para os diferentes graus de intensidade e percentual de positividade em próstatas caninas, utilizando-se o anticorpo primário anti COX-2.

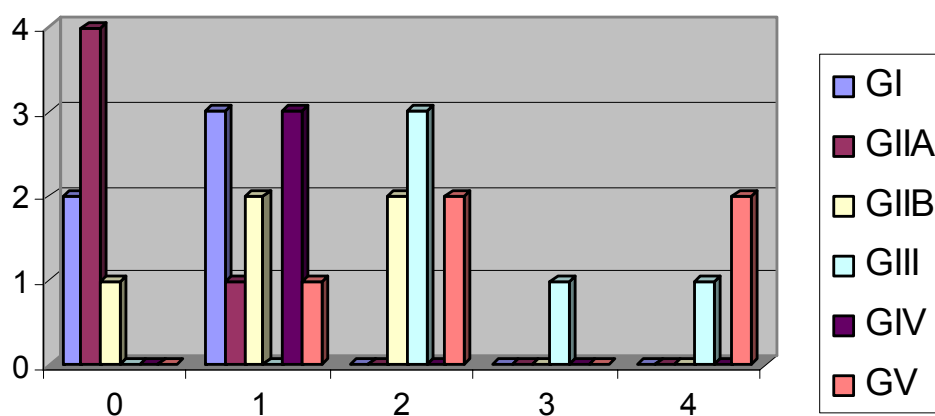
Grupo	Intensidade				Percentual de positividade				
	-	+	++	+++	0	1	2	3	4
GI	2	3	0	0	2	3	0	0	0
GIIA	4	1	0	0	4	1	0	0	0
GIIB	1	2	2	0	1	2	2	0	0
GIII	0	0	4	1	0	0	3	1	1
GIV	0	1	2	0	0	3	0	0	0
GV	0	1	2	2	0	1	2	0	2

GI – grupo controle (n=5); GIIA – hiperplasia epitelial (n=5); GIIB – hiperplasia estromal (n=5); GIII – PIA (n=5); GIV – PIN (n=3), GV – carcinoma prostático (n=5).

FIGURA 16 - Percentual de positividade (A) e intensidade de marcação (B) para o anticorpo primário anti COX-2

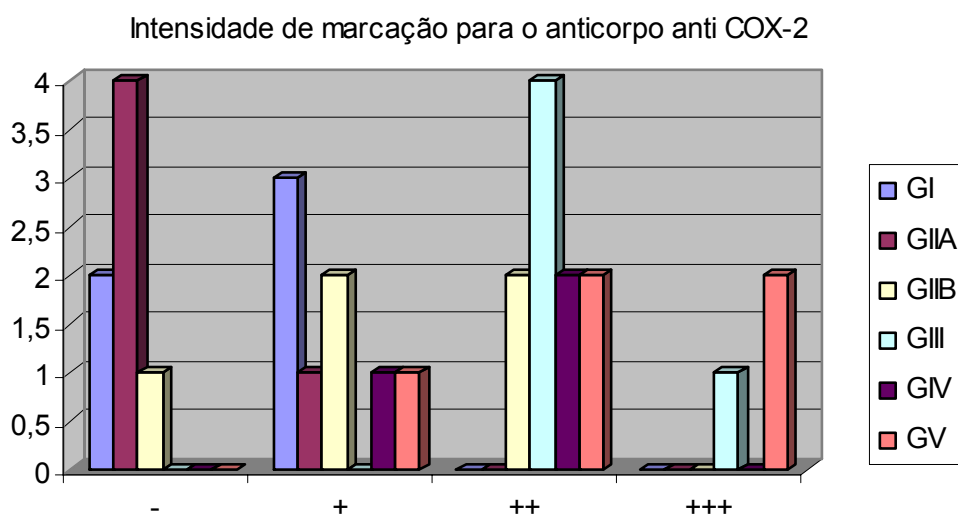
(A)

Percentual de positividade para o anticorpo anti-COX-2



0 – sem marcação; 1 – 1 a 25%; 2 – 26 a 50%; 3 – 51 a 75%; 4 – >76%

(B)



- sem marcação; + marcação fraca; ++ marcação moderada; +++ marcação intensa

No GI obtiveram-se três animais com menos de 25% das células marcadas e esses com grau fraco de intensidade. Os outros dois animais não apresentaram imunomarcação para a COX-2.

Observando-se os resultados do GII A e GIIIB (hiperplasias epitelial e estromal), cinco deles foram negativos para este anticorpo, três com marcação fraca e em menos de 25% dos campos analisados. Porém, no diagnóstico de hiperplasia estromal (GIIIB) houve dois animais com percentual de positividade escore 2 (entre 26 e 50%) e intensidade moderada. Estes resultados são semelhantes ao observado nos grupos III (PIA) e V (carcinoma), que tiveram três e dois animais com escore 2 para positividade, respectivamente.

Em relação à intensidade de marcação, quatro animais com PIA apresentaram ++ e um +++, o que caracteriza este grupo, bem como os com carcinoma, os mais intensamente marcados.

Para o diagnóstico de PIN, o percentual de positividade foi semelhante ao grupo controle (três animais com escore1), no entanto a intensidade de marcação foi maior (++ em dois animais) do que no grupo I.

O maior número de células marcadas por campo (escore 4) e maior intensidade (+++) ocorreu somente no grupo V (carcinoma). Houve dois

animais com escore 2 de positividade e ++ de intensidade e um com escore 1 e intensidade +.

Em relação a Figura 16 nota-se que o GlIA (hiperplasia epitelial) foi o que obteve maior número de animais sem marcação (escore 0) e com menor intensidade (-).

Nos grupos III (PIA) e V (carcinoma) observaram-se os maiores escores de positividade (3 e 4) e intensidade (++ e +++).

A imunomarcação para TGF- β também se apresentou citoplasmática, variando de intensidade e percentual de positividade em cada grupo (Tabela 3 e Figuras 17 a 22). Na próstata normal não ocorreu marcação nas células epiteliais, somente nas células estromais. Na hiperplasia epitelial a marcação foi discreta em células epiteliais secretórias. No grupo hiperplasia estromal se observou intensa marcação e percentual de positividade nas células estromais.

Nos grupos PIA e PIN, os focos de células atípicas apresentaram-se marcados. A imunomarcação no carcinoma foi em células neoplásicas, variando de intensidade e percentual de positividade.

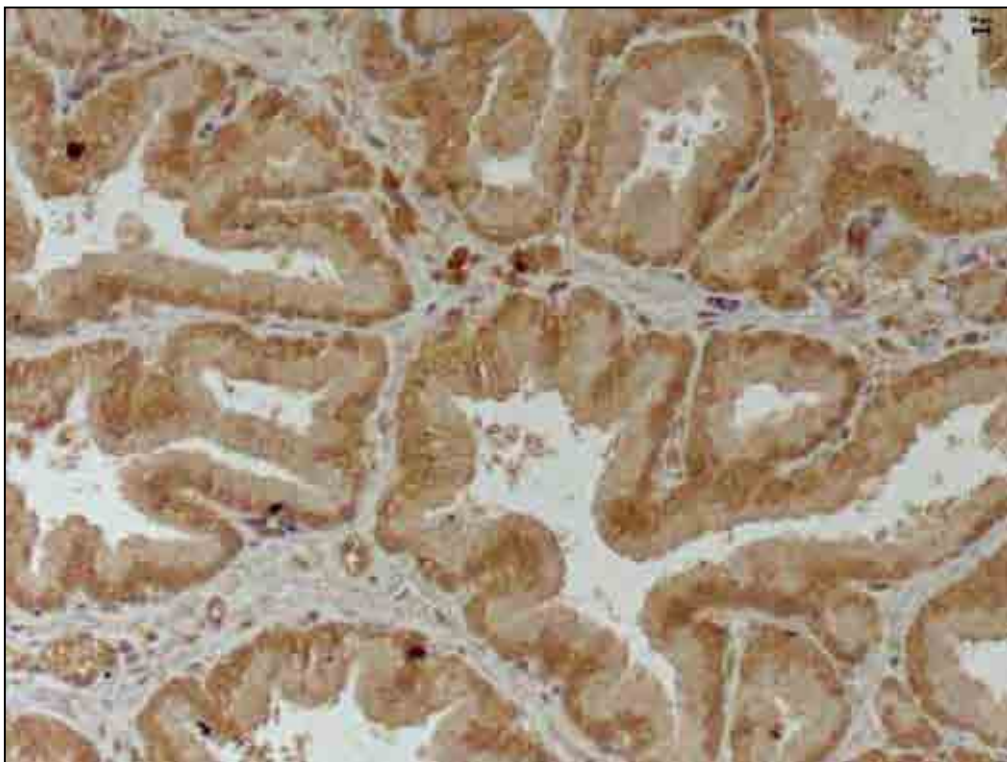


FIGURA 17 – Próstata normal. Imunomarcação em células estromais. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloração Hematoxilina.

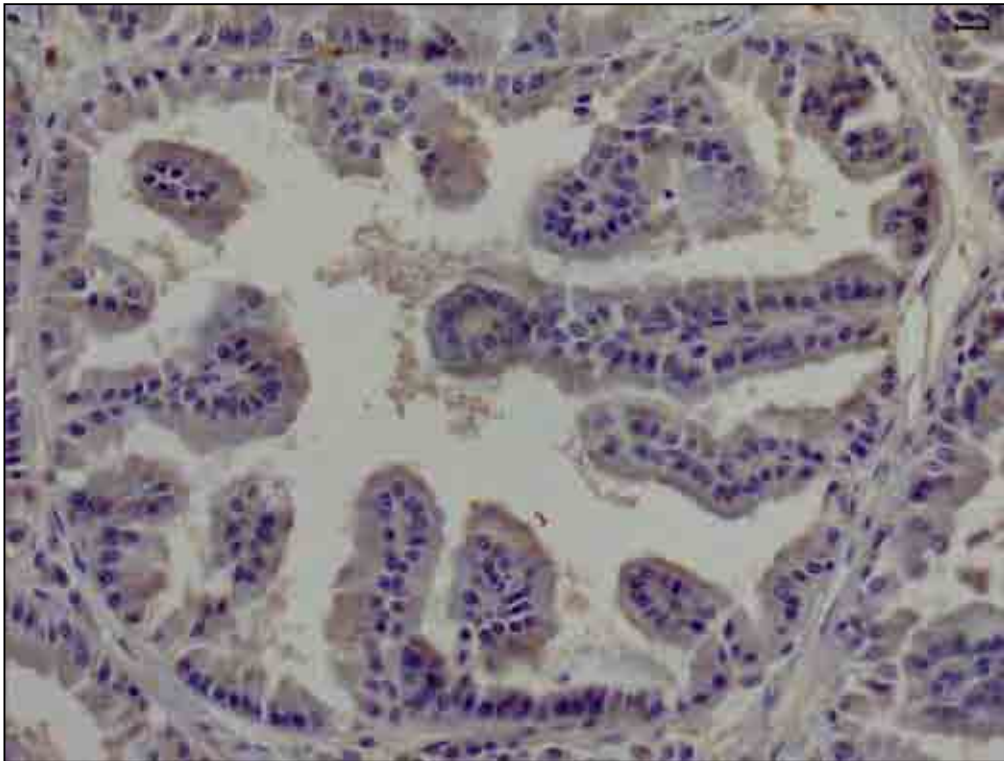


FIGURA 18 – Hiperplasia prostática epitelial. Discreta marcação em células epiteliais. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloração Hematoxilina.

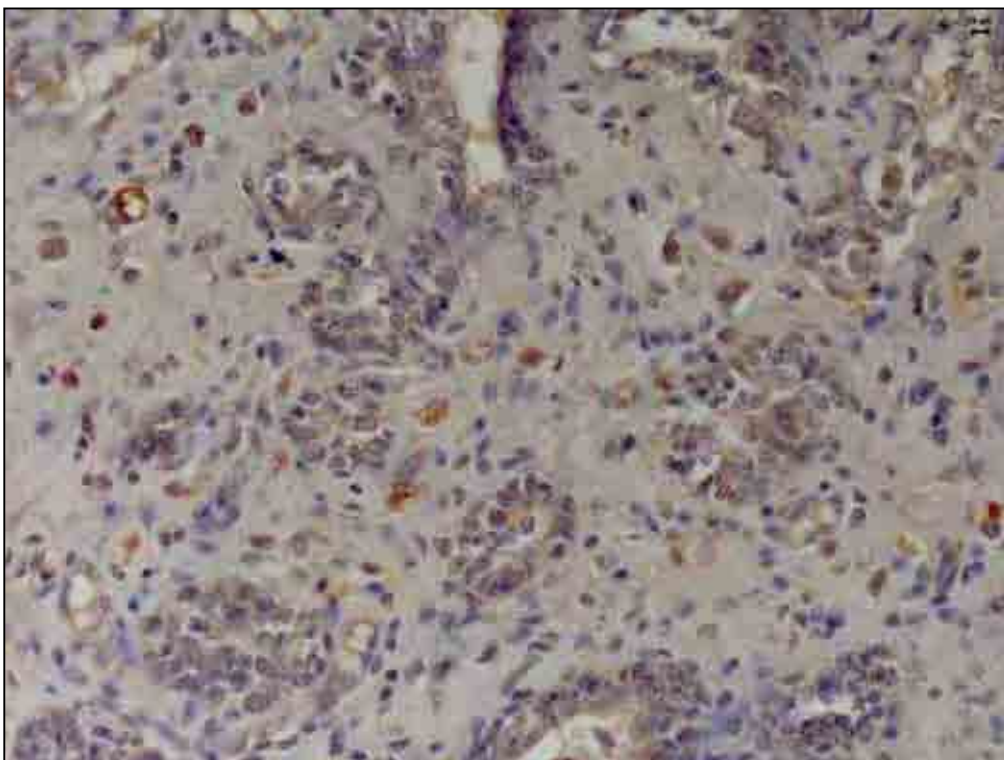


FIGURA 19 – Hiperplasia prostática estromal. Imunomarcacão em células estromais e células mononucleares. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloração Hematoxilina.

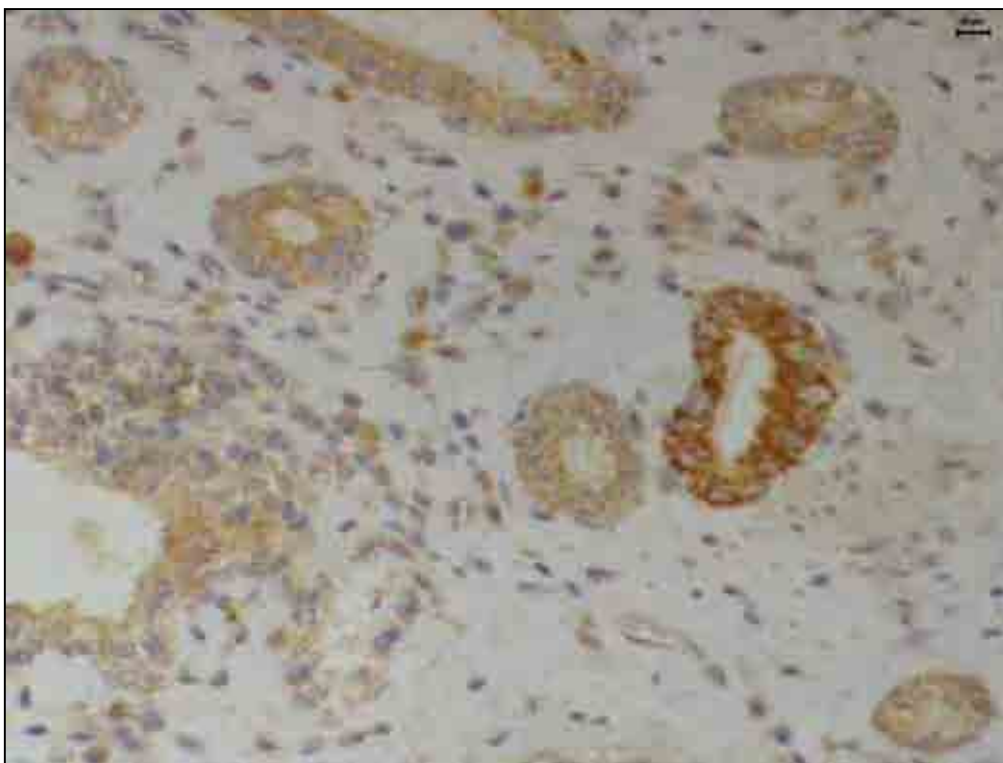


FIGURA 20 – Atrofia inflamatória proliferativa. Imunomarcção em células epiteliais e estromais. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloração Hematoxilina.

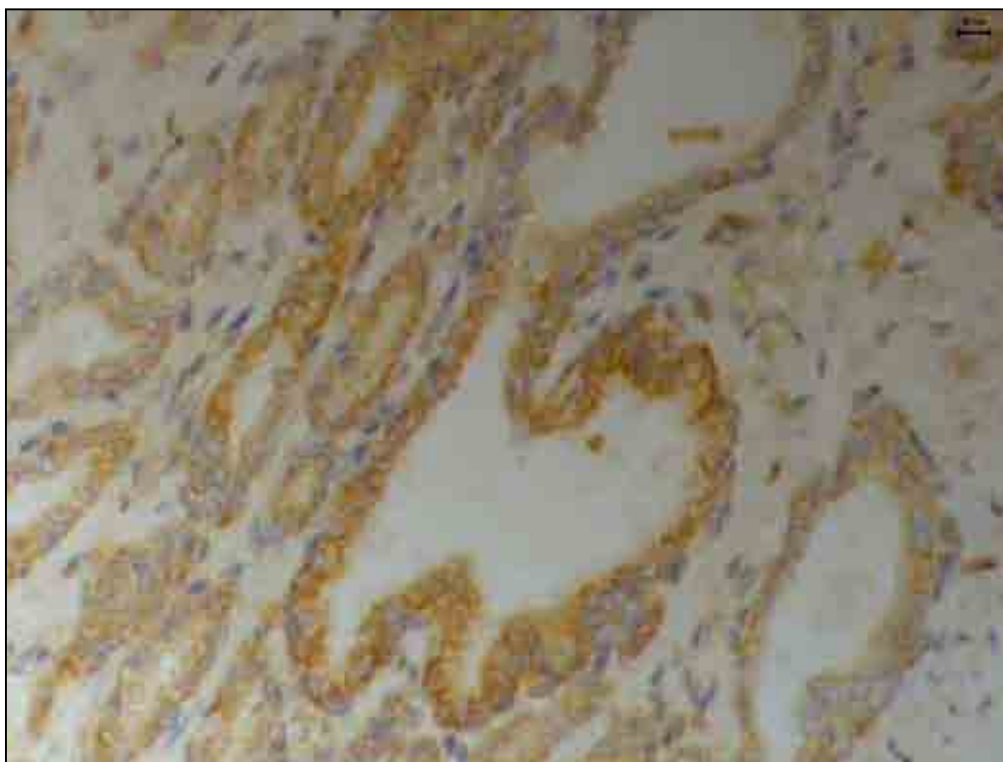


FIGURA 21 – Neoplasia intra-epitelial prostática. Imunomarcção em células epiteliais. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloração Hematoxilina.

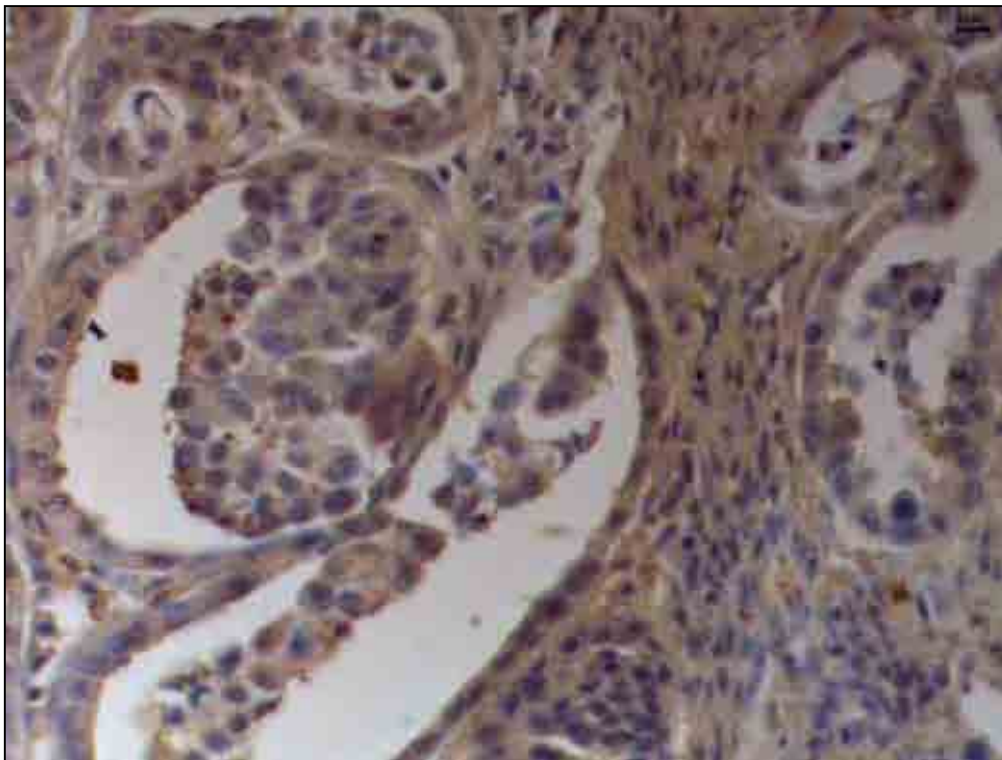


FIGURA 22 – Carcinoma prostático. Imunomarcacão em células epiteliais. Imunoistoquímica, LSAB, anticorpo primário TGF- β , DAB, contra-coloracão Hematoxilina.

Os resultados de intensidade de marcação e percentual de positividade para o anticorpo anti TGF- β estão apresentados na Tabela 3 e Figura 23.

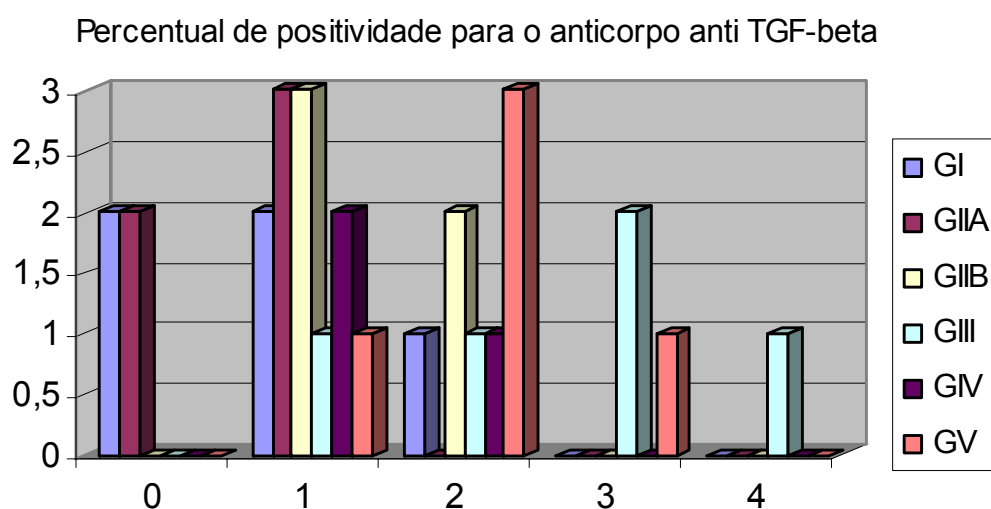
TABELA 3 - Número de casos marcados para os diferentes graus de intensidade e percentual de positividade em próstatas caninas, utilizando-se o anticorpo primário anti TGF- β .

Grupo	Intensidade				Percentual de positividade				
	-	+	++	+++	0	1	2	3	4
GI	2	2	1	0	2	2	1	0	0
GIIA	2	2	1	0	2	3	0	0	0
GIIB	0	2	3	0	0	3	2	0	0
GIII	0	1	2	2	0	1	1	2	1
GIV	0	2	1	0	0	2	1	0	0
GV	0	2	3	0	0	1	3	1	0

GI – grupo controle (n=5); GIIA – hiperplasia epitelial (n=5); GIIB – hiperplasia estromal (n=5); GIII – PIA (n=5); GIV – PIN (n=3), GV – carcinoma prostático (n=5).

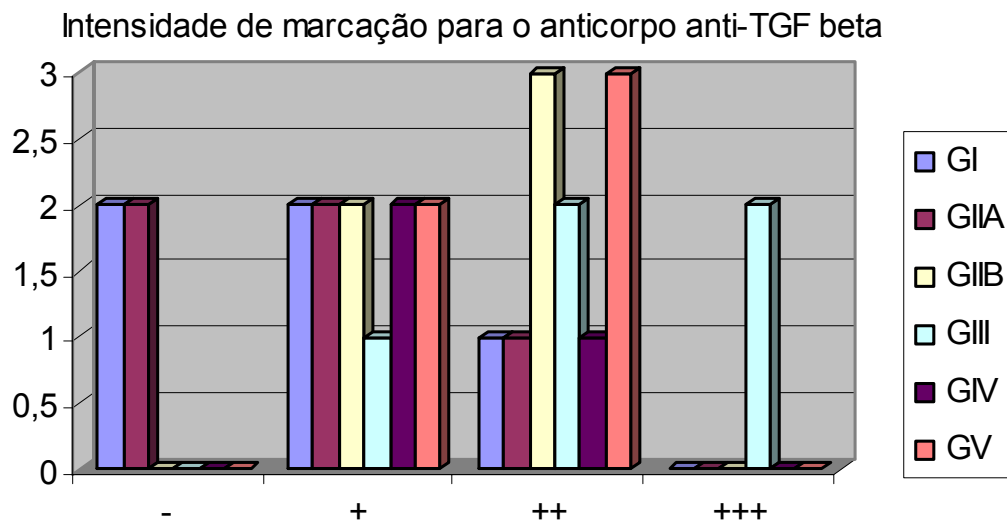
FIGURA 23 - Percentual de positividade (A) e intensidade de marcação (B) para o anticorpo primário anti TGF- β

(A)



0 – sem marcação; 1 – 1 a 25%; 2 – 26 a 50%; 3 – 51 a 75%; 4 – >76%

(B)



- sem marcação; + marcação fraca; ++ marcação moderada; +++ marcação intensa

Para o anticorpo primário anti TGF- β , os grupos GI (controle) e GIIA (hiperplasia epitelial) obtiveram dois animais, em cada, sem imunomarcação e nos animais controle, os demais tiveram o máximo escore com 50% de marcação e ++ de intensidade.

Concernente as hiperplasias, a estromal apresentou maior índice de positividade (escore 2) e três animais com intensidade moderada (++). A PIA (GIII) foi o diagnóstico com maior intensidade de marcação (+++) e percentual de positividade (escore 4), quando comparado aos demais grupos (Figura 11).

A correlação de TGF- β e COX-2 foi estabelecida pelo coeficiente de Sperman, verificou-se que esta apresenta significância positiva ($r=54,4\%$, $p<0,05$). Sendo assim, quando valores de contagem de células para COX-2 aumentam, o mesmo ocorre para TGF- β .

5. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que os animais não apresentaram focos de PIN com alta frequência, resultados estes discordantes com Waters & Bostwick (1997a) que utilizaram 35 cães sem evidências clínicas de doenças prostáticas para avaliar a incidência de HGPIN em glândulas supostamente normais e observaram focos de HGPIN em 55% dos cães, os quais não eram apresentavam idade entre sete e 17 anos.

Em estudo realizado, Rossignol et al. (2004) avaliaram 22 próstatas de cães com idade acima de sete anos e não castrados e, nenhum caso de HGPIN foi observado e apenas quatro animais apresentaram LGPIN.

Ressaltamos que os diagnósticos de PIN (GIII) neste estudo se referem a características morfológicas de HGPIN, uma vez que esta apresenta alta correlação com o câncer e por isso é de importância diagnóstica, como cita Billis (2003).

Questiona-se a baixa frequência de PIN em cães, uma vez que dados da literatura citam que homens que apresentam focos de HGPIN em biopsias têm de 27 a 100% de risco de ter carcinoma prostático (FENELEY & BUSCH, 1997). Entretanto, neste trabalho, em análises histopatológicas de câncer não se observou focos de PIN.

Algaba (1997) e Helpap (1998) afirmam que o mecanismo de diferenciação celular na PIN está restrito a camada de células basais, onde estas se tornam indiferenciadas facilitando a transformação neoplásica. Portanto há a necessidade de marcação imunoistoquímica do tipo de epitélio proliferativo para melhor caracterização desta lesão. Estes dados são diferentes dos demais, pois a atipia, de acordo com Bostwick (1997), é do epitélio secretor, como observado neste estudo.

Lesões atípicas como a PIN e a PIA são consideradas por alguns autores, lesões precursoras do carcinoma prostático. Atualmente duas linhas são seguidas para o estudo da patogenia do câncer prostático.

Waters & Bostwick (1997a) descreveram a displasia epitelial prostática, caracterizando-a e a forte correlação de HGPIN com adenocarcinoma prostático. A displasia está restrita às células epiteliais secretoras, que se transformam em células neoplásicas.

O grupo de De Marzo em 1999 relacionou o processo inflamatório crônico inespecífico observado nas próstatas humanas com o desenvolvimento de câncer. A produção local de radicais livres pelas células inflamatórias pode levar a lesão do DNA das células epiteliais prostáticas que sofrem mutação em protooncogenes e genes supressores do câncer, dando início ao processo neoplásico.

Ainda, a liberação de citocinas pelas células inflamatórias estimula a proliferação celular e angiogênese, no intuito de haver o reparo e as células transformadas metastatizam (COTRAN et al., 2001).

No presente estudo, observou-se alta incidência de inflamação inespecífica nas próstatas caninas associado à atipias epiteliais. O infiltrado inflamatório presente nestas lesões pode produzir espécies reativas do oxigênio, resultando em dano ao DNA. Portanto, acreditamos que os cães possam desenvolver focos de carcinoma com maior frequência quando associado ao processo inflamatório (PIA).

Os resultados obtidos corroboram com esta observação, uma vez que os grupos III (PIA) e V (carcinoma) foram os únicos a apresentarem maior expressão de COX-2, tanto em quantidade, como em intensidade (Tabela 2).

Cães com PIN (GIV) tiveram escore 1 de positividade (<26%) e intensidade moderada (Tabela 2), sugerindo que se esse processo evolua para neoplasia, a influência da COX-2 como promotor da proliferação celular, angiogênese e inibição da apoptose é menor do que na PIA e carcinoma.

Dados na literatura citam que as neoplasias prostáticas em cães apresentam baixa frequência (CORNELL et al., 2000), o que supomos que estes números sejam subestimados, pois os adenocarcinomas nem sempre causam aumento de volume da glândula como as hiperplasias e os processos inflamatórios, além de serem observados focos sem sintomatologia como o que foi verificado neste trabalho, onde os cinco casos de neoplasia prostática foram diagnosticados em pequenos focos, sem aumento glandular.

Observou-se também que as metástases de carcinoma prostático ocorrem no sistema músculo esquelético, onde se diagnosticou metástase de adenocarcinoma em articulação femuro-tíbio-patelar de um cão, Boxer, macho, 13 anos. Estes dados são concordantes com Cornell et al. (2000) que descrevem o envolvimento de metástases ósseas em 36% dos cães avaliados e aparecimento de metástases em 80% dos casos. Ainda, este caso apresentou intensa marcação para COX-2, que, segundo Shaedi et al. (2006) esta enzima é promotora de angiogênese e metástases.

No estudo de Sugar (2006), a PIA apresentou elevado percentual de positividade para imunomarcação de COX-2. Neste grupo, a marcação foi observada nas células atípicas, o que sugere papel fundamental desta proteína na progressão da lesão pré-neoplásica em neoplásica, assim como descrito por Patel et al. (2005).

Apesar de ser estatisticamente positiva a intensidade de marcação de COX-2 entre os grupos GIII (PIA) e GIV (PIN), o primeiro deles obteve escores maiores de intensidade (quatro animais ++ e um +++) do que os com PIN (um animal + e dois ++). A maior expressão de COX-2 nos casos de PIA, onde se encontra intenso infiltrado inflamatório, indica que esta lesão seja precursora do câncer prostático, uma vez que a inflamação apresenta relação com o desenvolvimento de neoplasias prostáticas assim como mencionado por De Marzo et al. (2003) e Shahedi et al. (2006).

No grupo V (carcinoma) houve variação do percentual de positividade (um animal 1; dois animais 2 e dois animais 4), o que pode estar relacionado com neoplasias de graus de diferenciação histológica, ou seja, tumores indiferenciados ou metastáticos apresentaram positividade maior do que 75%.

Se levarmos em consideração o percentual de positividade de COX-2 de cada grupo, podemos verificar no grupo controle que três animais tiveram marcação entre 1 e 25% (escore 1) e dois não apresentaram marcação (escore 0). No grupo IV (PIN) todos os animais receberam escore 1 de marcação, mas este grupo é composto por apenas três animais. Nos animais com carcinoma (GV), dois deles foram escore 4 (>75% de marcação), dois foram escore 2 e um escore 1. Isso demonstra grande diferença biológica, uma

vez que em nenhum dos outros grupos houve marcação em mais de 75% do campo, apesar da semelhança estatística.

Neste estudo a imunomarcação para COX-2 mostrou-se significativa em focos de PIN, PIA e nos carcinomas. Tais resultados são concordantes com os de Gupta et al. (2000) no que diz respeito ao aumento da intensidade de marcação em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, porém com maior enfoque para PIA e carcinoma.

Contrariamente, Zha et al. (2001) afirmam que os níveis de COX-2 se mostram baixos ou ausentes na maioria das neoplasias prostáticas, entretanto, não citam o grau de diferenciação dos tumores.

Diferente dos resultados observados em cães sem alterações prostáticas, onde a imunomarcação epitelial ocorreu em intensidade baixa, Kirschenbaum et al. (2001) relatam expressão de COX-2 na musculatura lisa e em algumas células basais. As células luminais nestas glândulas não expressam esta enzima, porém são positivas quando encontradas em áreas que existam focos inflamatórios.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde a marcação foi observada em células inflamatórias localizadas no estroma e nas células glandulares quando estas estavam associadas a processo inflamatório.

Concordando com Hussaim (2002), observamos que há marcação expressiva de COX-2 em adenocarcinoma e PIN, no entanto esta é mais marcante em áreas de atrofia inflamatória proliferativa (PIA).

Acreditamos que a elevada intensidade de marcação da COX-2 em lesões atróficas associadas a processo inflamatório crônico implica na participação da inflamação na progressão das neoplasias.

O processo inflamatório resulta no influxo de células inflamatórias para o local da lesão as quais produzem oxigênio reativo, desencadeando o estresse oxidativo crônico que tem como principal consequência a peroxidação lipídica e geração de outros produtos que apresentam a capacidade de lesionar o DNA, o que representa o desenvolvimento de neoplasias (PALAPATTU et al., 2004; SUGAR, 2006).

Sabendo-se que o TGF- β é produzido pelas células estromais prostáticas e apresenta como funções o suprimento da proliferação tecidual, diferenciação, estímulo à apoptose e indução à angiogênese (Niu et al. 2001), apresenta, portanto, papel importante na evolução de lesões pré-neoplásicas em neoplásicas.

Em relação a proliferação e inibição da apoptose, o TGF- β e a COX-2 desempenham papel contrário, portanto em lesões com elevada marcação de COX-2, acredita-se que baixos níveis de TGF- β sejam encontrados, o que não foi observado, neste trabalho nos casos de neoplasias, em que as duas proteínas mostraram-se elevadas.

Com relação à marcação do anticorpo anti TGF- β observou-se que o grupo GLIB apresenta maior e mais intensidade de marcação, provavelmente pelo processo inflamatório que está associado às hiperplasias estromais, como descrito por Laufer-Amorim (2004).

Nas glândulas com hiperplasia estromal notou-se expressão mais acentuada de TGF- β quando comparada à hiperplasia epitelial devido à importância do estroma no desenvolvimento desta lesão, pois altera a diferenciação das células epiteliais (KLAUSNER et al., 1994). O TGF- β se acumula nas células estromais, contribuindo para progressão da HPB (NIU et al., 2001).

O grupo V (carcinoma) obteve o percentual de positividade diferente dos grupos I (controle) e IIA (hiperplasia epitelial), mas não a intensidade, o que demonstra que essa proteína está presente em maior quantidade nas neoplasias do que nas lesões hiperplásicas, assim como exposto por Wolff et al. (1998).

Uma vez conhecendo-se o papel da COX-2 e TGF- β e a existência de correlação entre essas proteínas, como observado neste estudo ($r=54,4\%$; $p<0,05$), a elucidação de alguns aspectos da patogenia do câncer prostático no cão, ganha algumas importantes contribuições, que certamente poderão auxiliar no diagnóstico precoce, tratamento acurado e maior sobrevivência dos animais.

6. CONCLUSÕES

- Os animais com carcinoma apresentaram o maior percentual e intensidade de imunomarcacão para o anticorpo primário anti COX-2, seguidos pela atrofia prostática inflamatória;
- A COX-2, em próstatas caninas, apresenta papel importante no desenvolvimento de câncer prostático pela imunomarcacão observada nos diferentes grupos;
- A atrofia prostática inflamatória e a neoplasia intra-epitelial prostática podem ser consideradas lesões pré-neoplásicas, pela marcacão de COX-2 intermediária;
- Os focos de atrofia prostática inflamatória foram os que obtiveram maior escore de percentual de positividade e intensidade de marcacão para o anticorpo primário anti TGF- β ;
- A imunomarcacão para TGF- β na atrofia prostática inflamatória e na neoplasia intraepitelial prostática mostrou-se marcante no componente estromal, o que implica o papel destas afecções na evoluçao do câncer prostático, provavelmente pela estimulacão da angiogênese que o TGF- β promove;
- Existe uma correlaçao entre a expressao de COX-2 e TGF- β nas afecções prostáticas caninas estudadas, indicando que o aumento ou diminuicão de uma delas causa o mesmo efeito na outra.
- A PIA ocorre em cães com os mesmos padrões morfológicos do que os descritos para o homem, sendo que mais estudos devem ser feitos na espécie canina, a fim de se verificar se esta ocorre antes do PIN e carcinoma, como nos humanos.

7. BIBLIOGRAFIA

ALGABA, F. Neoplasia intra-epitelial prostática. **Urol. Contemp.** v.3, n.3, p. 174-179, 1997.

BAKLE, Y. S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p 1137-1150, 2001.

BARSANTI, J.A.; FINCO, D.R. Moléstias prostáticas do cão. In: ETTINGER, S.J. (eds). **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, v.4, p. 1941-1963, 1992.

BENOIT, G.; JARDIN, A.; GILLIOT, C. Reflections and suggestions on the nomenclature of the prostate. **Surg. Radiol. Anat.**, v.15, p.325-332, 1993.

BILLIS, A. Neoplasia intra-epitelial prostática. In: **Patologia cirúrgica da próstata**, Digital do Brasil Gráfica, Campinas, 2003.

BONKHOFF, H.; FIXEMER, T.; HUNSICKER, I.; REMBERGER, K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. **American Journal of Pathology**, v.155, p. 641-647, 1999.

BOSTWICK, D.G.; BRAWER, M.K. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. **Cancer**, v. 59, p. 788-794, 1987.

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

BOSTWICK, D.G. Neoplasms of the prostate. In: Bostwick, D.E.; Eble, J.N. **Urologic Surgical Pathology**, St. Louis: Mosby, p.343-421, 1997.

BOSTWICK, D.G.; RAMMANI, D.; QIAN, J. Prostatic intraepithelial neoplasia: Animal models 2000. **The prostate**, v.43, p.286-294, 2000.

BURCK, R.L.; ARCKERMAN, N. The abdomen. **In: Small Animal Radiology and Ultrasonography.** A diagnostic atlas and text. 2 ed. San Diego: W.B. Saunders, p.401-410, 1996.

CHEW, D.J. An overview of prostatic disease. **Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.19, n.3, p. 80-85, 1997.

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

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Inflammation. **In: Robbins, Pathological basis of disease.** 6ed, Philadelphia: W.B. Saunders, 1999.

DE MARZO, A.M.; MARCHI, V.L.; EPSTEIN, J.I.; NELSON, W.G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate. **Am. J. Pathology**, v. 155, n. 6, p.1985-1992, 1999.

DE MARZO, A.; MEEKER, A.K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E.A.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. Human prostate cancer precursors and pathobiology. **Urology**, v. 62, p.55-62, 2003.

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

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.

FENELEY, M.R.; BUSCH, C. Precursor lesions for prostate cancer. **J. Royal Soc. Med.**, v. 90, p. 533-539, 1997.

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

HELLSTROM, M.; RANEFALL, P.; WESTER, K.; BRANDSTEDT, S.; BUSCH, C. Effect of androgen deprivation on epithelial and mesenchymal tissue components in localized prostate cancer. **Brit. Journal of Urology**, v.79, p.421-429, 1997.

HELPAP, B. Differential diagnosis of glandular proliferations in the prostate. A conventional and immunohistochemical approach. **Virchows Arch.**, v. 433, p. 397-405, 1998.

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

ISAACS, J.T. Common characteristics of human and canine benign prostatic hyperplasia. **Prog. Clin. Biol. Res.**, p. 145-217, 1984.

JOHNSTON, S.D.; MARGARET, V.; KUSTRITZ, R.; OLSON, PS. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: WB Saunders, 592p, 2001.

KAMIJO, T.; SATO, T.; NAGATOMI, Y.; KITAMURA, T. Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitors in prostate cancer cell lines. **Int. Journal Uro.**, v. 8, p.35-39, 2001.

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.

KLAUSNER, J.S.; BELL, F.W.; HAYDEN, D.W.; JOHNSTON, S.D.; LUND, E.M. Recent developments in the diagnosis and treatment of BHP and prostatic carcinoma. **Proc. Am. Coll. Vet. Int. Med.**, p.547-548, 1994.

KULKARNI, S.; RADER, J.S.; ZHANG, F.; LIAPIS, H.; HOKI, A.T.; MASFERRER, J.L.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.7, p.429-34, 2001.

KRAWIEC, D.R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in dogs: 177 cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.200, n.8, p.1119-1122, 1992 .

LAUFER AMORIM, R. Estudo clínico, laboratorial e anátomopatológico das próstatas de cães adultos. Botucatu, 2001. 116p. **Tese (Doutorado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

LEAV, I.; McNEAL, J.E.; ZIAR, J.; ALFROY, J. The localization of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in stromal and epithelial compartments of developing human prostate and hyperplastic, dysplastic and carcinomatous lesions. **Human Pathology**, v.29, n.7, 1998.

LOWSETH, L.A.; GERLACH, R.F.; GILLET, N.A.; MUGGENBURG, B.A. Age-related in the prostate and testes of the beagle dog. **Vet. Pathol.**, v.37, p. 347-353, 1990.

MA, Q.J.; GU, X.Q.; CAO, X.; ZHAO, J.; KONG, X.B.; LI, Y.X.; CAI, S.Y. Effect of β radiation on TGF- β 1 and bFGF expression in hyperplastic prostatic tissues. **Asian J. Andrology**, v.1, p.49-54, 2005.

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

MOLINE, V. Néoplasie intra-épithéliale (PIN) prostatique. Diagnostic et conduite à tenir. **Ann. Pathol.**, v.21, p.245-254, 2001.

MUKHERJEE, R.; EDWARDS, J.; UNDERWOOD, M.A.; BARLETTI, M.S. The relationship between angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression in prostate cancer. **International**, v.96, p62-66, 2005.

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.

NIU, Y.; XU, Y.; ZHANG, J.; BAI, J.; YANG, H.; MA, T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **BJU International**, p.386-393, 2001.

OLSON, P.N.; WRIGLEY, R.H.; THRALL, M.A. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. **Comp. Cont. Ed.**, v.9, p.613-23, 1987.

PALAPATTU, G.S.; SUTCLIFFE, S.; BASTIAN, P.J.; PLATZ, E.A.; DE MARZO, A.M.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**, v.26, n.7, p.1170-1181, 2004.

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.

PERALTA-ZARAGOZA, O.; LAGUNAS-MARTINEZ, Q.B.P.A; MADRID-MARINA, M.V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, function y mecanismo de regulacion en cancer. **Salud publica Mex.**,v.43, n.4, 2001.

PURSWELL, B.J.; BEVERLY, J. Prostatic diseases in dogs: a review. **Vet. Med.**, p.315-321, 2000.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, p.509-518, 2000.

ROGERS, K.S.; WANTSCHER, L.; LEES, G.E. Diagnostic evaluation of the canine prostate. **Compend. Cont. Educ. Small Anim. Pract.**, v.8, n.11, p.799-811, 1986.

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.

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

SHAHEDI, K.; LINDSTROM, S.; ZHENG, S.L.; WIKLUND, F.; ADOLFSSON, J.; SUN, J.; AUGUSTSSON-BALTER, K.; CHANG, B.L.; ADAMI, H.O.; GRONBERG, H.; XU, J. Genetic variation in the COX-2 gene and the association with prostate cancer risk. **Int. J. Cancer**, v.119, p.668-672, 2006.

SUGAR, L.M. Inflammation and prostate cancer. **Canadian Journal of Urology**, 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.

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

VERCELLI, A.; BELLONE, G.; ABATE, O.; EMANUELLI, G.; CAGNASSO, A. Expression of transforming growth factor- β isoforms in the skin, kidney,

pancreas and bladder in German Shepherd Dog affected by **RCND**. **J. Vet. Med.**, v.50, p.506-510, 2003.

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.; BOSTWICK, D.G. Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. **The Journal of Urology**, v. 157, p 713-716, 1997b.

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.

WOLFF, J.M. et al. Transforming growth factor- β 1 serum concentration in patients with prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. **Brittish J. of Urology**, v.81, p. 403-405, 1998.

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.

ZHOU, W.; PARK, I.; PINS, M.; KOZLOWSKI, J.M.; JOVANOVIĆ, B.; ZHANG, J.; LEE, C.; ILIO, K. Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor- β 1. **Endocrinology**, v.144, p.4280-4284, 2003.

**Anexo A: Soluções utilizadas na técnica de imunoistoquímica FMVZ –
UNESP/ Botucatu – Serviço de Patologia**

Soluções utilizadas na recuperação antigênica

Citrato 10 Mm (pH 6,0)

1000 ml de água destilada

2,1 g ácido cítrico monohidratado

EDTA 10 Mm (pH 8,0)

1000 ml de água destilada

0,3722 g EDTA (ácido etilenodiaminotetra sal dissódico)

TRIS Solução tampão (pH 7,4)

1000 ml de água destilada

6,0 g Trizma base

8,5 g cloreto de sódio