

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA
ESTERASE ESPECÍFICA DA PRÓSTATA CANINA (CPSE),
DO ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E DA
FOSFATASE ÁCIDA PROSTÁTICA (PAP) EM CÃES**

Carla Renata Figueiredo Gadelha
Médica Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2008**

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

**EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA
ESTERASE ESPECÍFICA DA PRÓSTATA CANINA (CPSE),
DO ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E DA
FOSFATASE ÁCIDA PROSTÁTICA (PAP) EM CÃES**

Carla Renata Figueiredo Gadelha

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2008**

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARLA RENATA FIGUEIREDO GADELHA - Natural de SOUSA, PB, nascida em 18 de julho de 1974, ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará em fevereiro de 1992 concluindo-o em dezembro de 1996. Concluiu o curso de Especialização em Avicultura, pela Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará em julho de 2000. Em março de 2002 iniciou curso de mestrado em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, na Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal, concluindo-o em outubro de 2003. Ingressou no curso de Doutorado, pelo Programa de Pós Graduação em Cirurgia Veterinária, desta Universidade, em março de 2004.

“Hoje é a semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá
Nós podemos tudo, nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será”
Gonzaguinha

Dedico,
ao meu marido Adriano (*in memoriam*) que me
ensinou a amar, a sonhar, a trabalhar e a não
desistir nunca. Não estaria aqui hoje se não
fosse seu incentivo, seu apoio e seu amor a
mim e à nossa família.
Amarei você para sempre!

Dedico,
aos meus pequenos tesouros, razão de toda a
minha vida, meus filhos Adriano e Catarina.
Vocês me ensinam a cada dia a paciência, a
compreensão, a confiança e o amor
incondicional. Amo vocês mais do que tudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, mesmo com minha pouca fé, nunca me desamparou. Levou-me em seus braços nos momentos em que fraquejei e caminhou junto comigo por toda essa jornada.

A minha família, meu porto seguro, que sofreu e vibrou comigo, com quem posso contar em todo e qualquer momento. Vocês são o bem mais precioso que tenho, sem vocês não sei como seria possível a realização de mais esse sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu própria não acreditava. Para mim e para todos os seus orientados você é sobretudo um grande amigo, perto de quem nos sentimos seguros e confiantes.

As minhas irmãs, se não de sangue, de coração, Ana Paula, Aracelle Eliandra, Maricy, e Gabriela. Vocês me provam a cada dia que é possível confiar, esperar e amar sem pedir nada em troca. A amizade de vocês é muito importante para mim e mesmo que a distância teime em estar entre nós, vocês sempre estarão em meu coração.

A família da Obstetrícia, Arnildo, Diogo, Giuliano e Tathiana amigos queridos e solícitos. Poder estar perto de vocês fez minha passagem por Jaboticabal mais feliz.

Aos queridos amigos Maria e Suedney Lima e seus filhos, Vitor e Lucas, por me acolherem em sua casa e me deixarem fazer parte da família. Até hoje sinto saudades das nossas conversas noite adentro.

Aos queridos amigos da “família NUGEN”, da Universidade Estadual do Ceará, Carol, Samara, Michel, Michele, Cássia, Marcília, Thiago, Daniel, Daniel Viana, David, Gustavo e Howard por toda ajuda, incentivo, estímulo, confiança e amizade. Vocês surgiram na minha vida na hora exata, como anjos. Vocês não foram só importantes para a parte técnica desse trabalho, mas também por

tornarem cada momento prazeroso e alegre. Além de me fazerem perceber novamente como a vida é bela.

As professoras Dra. Diana Magalhães de Oliveira e Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva por sua atenção, confiança e valiosos ensinamentos. Vocês são exemplos de retidão profissional e pessoal.

As professoras Dra. Adriana da Rocha Tomé e Dra. Geane Matos Cunha pela imensurável colaboração e disponibilidade em ajudar.

Aos amigos Dr. Paulo Rosa e Dra. Poliana Giachetto pelo auxílio na elaboração do projeto de pesquisa e por me iniciarem no mundo da Biologia Molecular.

Aos pós-graduandos da neurofarmacologia, do Depto. de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, Flávio e Daniela, pelo auxílio com a imunoistoquímica. Aprendi muito com as nossas discussões.

As amigas, Ana Cláudia, Ana Gláudia e Sônia por todo auxílio, amizade, disponibilidade e torcida nesses três anos de convivência.

Aos colegas Evaniza Alves e Paulo Roberto Fernandes , do Centro de Controle de Zoonoses, de Fortaleza- CE, por todo o apoio e compreensão nas colheitas das amostras.

Aos meus amigos Andréia, Diego, Gilney, Gislaine e Karine pelo auxílio nas necrópsias e colheita do material. O trabalho era árduo, mas com a ajuda de vocês ficou mais fácil.

Aos funcionários do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, especialmente, Anésia, Bertanha, Carlos, Eugênio, Isilda, Lalá e Márcia, pela amizade e incentivo.

Aos cães que participaram desse estudo e que são a razão maior de toda essa empreitada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP,
pelo auxílio financeiro ao projeto.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	Xvii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Diagnóstico de afecções prostáticas.....	7
2.1.1. Ultra-sonografia.....	7
2.1.2. Marcadores teciduais da próstata.....	9
2.1.3. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	13
2.1.4. Imunoistoquímica.....	15
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Animais e local de execução do experimento.....	18
3.2 Ultra-sonografia.....	19
3.3 Histopatologia	20
3.4. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	20
3.5. Imunoistoquímica.....	24
3.6. Análise estatística.....	26
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Ultra-sonografia e histopatologia.....	27
4.2. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	32
4.3. Imunoistoquímica.....	43
V. CONCLUSÕES.....	47
VI REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mensuração das dimensões craniocaudal (CC) e ventrodorsal (VD), da próstata de cão, obtidas por ultrasonografia.....	19
Figura 2 -	Imagem ultra-sonográfica da próstata de cão, via transretal, em tempo real, modo B, plano sagital e frequência de 5 MHz com lesão cavitária prostática	27
Figura 3 -	Fotomicrografias de tecido prostático canino obtido por necrópsia.....	31
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da esterase específica da próstata canina (CPSE) do grupo A.....	32
Figura 5 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da esterase específica da próstata canina (CPSE) dos grupos B e C.....	33
Figura 6 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da fosfatase ácida prostática (PAP) do grupo A.....	34
Figura 7 -	Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da fosfatase ácida prostática PAP dos grupos B e C.....	34
Figura 8.	Comparação de intensidade das bandas em gel de agarose a 1% entre a esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e a β -actina de amostras do grupo D.....	38
Figura 9 -	Eletroferograma de um produto de PCR para esterase específica da próstata canina (CPSE).....	40
Figura 10-	Eletroferograma de um produto de PCR para fosfatase ácida prostática (PAP), da posição 90 a 280.....	41
Figura 11-	Fotomicrografia de reação imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti-PSA (DAKO “mouse anti-human” N1550), pela técnica de streptoavidina-biotina-peroxidase, com recuperação antigênica, sem contra-coloração.....	45

Figura 12- Fotomicrografia de reação imunoistoquímica com anticorpo policlonal anti-PAP (DAKO “rabbit anti-human” N1518), pela técnica de streptavidina-biotina-peroxidase, com recuperação antigênica, contra-corado com Hematoxilina de Mayer46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüências de oligonucleotídeos (“primers”) utilizados na PCR para amplificação de cDNA das proteínas esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e antígeno específico da próstata (PSA) e o tamanho esperado do produto amplificado.....	22
Tabela 2 -	Escores aplicados na análise da marcação imunoistoquímica....	26
Tabela 3 -	Médias e desvios padrão das variáveis: peso corpóreo (PC), dimensões craniocaudais (CC) e ventrodorsais (VD) e peso da próstata (PP) de cães dos grupos A, B, C e D.....	28
Tabela 4 -	Quantidade aproximada dos produtos da PCR da esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e β -actina obtida por meio da mensuração das bandas realizada por software Image Aide 3.06.04 Analysis Software – Spectronics Corporation, nos grupos A, B, C e D.....	36
Tabela 5 -	Comparação das seqüências obtidas no ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, para as proteínas esterase específica da próstata canina (CPSE) e fosfatase ácida prostática (PAP), com as seqüências de nucleotídeos dessas proteínas disponíveis no Genbank, utilizando o BLASTn.....	42

APÊNDICE

Apêndice 1 -	Lei Municipal 8966. Dispõe sobre a prevenção e controle das zoonoses.....	59
Apêndice 2 -	Protocolo de extração de RNA total com TRIzol®.....	70
Apêndice 3.-	Preparação da amostra para quantificação em espectrofotômetro	70
Apêndice 4 -	Protocolo de transcrição reversa.....	71
Apêndice 5 -	Componentes da reação de PCR com Platinum Taq polimerase	72
Apêndice 6 -	Protocolo de reação de seqüenciamento.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
C	Citosina
CC	craniocaudal
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CPSE	Esterase específica da próstata canina
°C	Graus Celsius
DAB	diaminobenzidina
DEPC	Deionized diethylpyrocarbonate
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Est	Estroma
FAP	Fator anti-bacteriano prostático
G	guanina
G[*]	Gravidade
HE	Hematoxilina-eosina
hK2	Calicreína 2
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IHQ	Imunoistoquímica
Kb	Kilobase
MHz	Megahertz
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ng	nanograma
NIP	Neoplasia intra-epitelial prostática
PAP	Fosfatase ácida prostática
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PP	Peso da próstata

PSA		Antígeno específico da próstata
PC		Peso corpóreo
RNA		Ácido ribonucléico
RNAm		Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR		Transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase
T		Timina
TBS		Solução salina tamponada
UECE		Universidade Estadual do Ceará
UFC		Universidade Federal do Ceará
VD		Ventrodorsal
%		Por cento

EXPRESSÃO GÊNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DA ESTERASE ESPECÍFICA DA PRÓSTATA CANINA (CPSE), DO ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E DA FOSFATASE ÁCIDA PROSTÁTICA (PAP) EM CÃES.

Resumo – Quarenta e sete cães machos e não castrados foram divididos em três grupos de acordo com a faixa etária em: animais adultos jovens (grupo A), animais de meia idade (grupo B) e idosos (grupo C). Dez animais com alterações prostáticas visíveis à ultra-sonografia foram reunidos no grupo D, independentemente da idade. Os animais foram eutanasiados, submetidos à ultra-sonografia transretal e excisão da glândula. Foram colhidas amostras para exame histopatológico, transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e imunoistoquímico. A histopatologia revelou que todos os cães dos grupos B, C e D apresentavam afecção prostática, sendo a hiperplasia prostática (HPB) a mais freqüente. A maioria dos animais apresentava mais de um tipo de afecção simultaneamente, especialmente HPB e prostatite não bacteriana. A RT-PCR foi realizada para as enzimas CPSE, PAP e PSA, obtendo-se amplificação das amostras para CPSE e PAP, mas não para o PSA. Não houve diferença significativa na quantidade de âmplicons de CPSE entre as amostras do grupo A, B e C, mas esse valor foi significativamente maior no grupo D. A quantidade de âmplicons para a PAP não variou entre os grupos. Tampouco houve correlação entre a quantidade de âmplicons para as diferentes enzimas ou entre esses valores e as dimensões prostáticas na ultra-sonografia. Observou-se imunorreação fraca e pouco extensa (++) nos tecidos prostáticos dos animais dos grupos A e B para o PSA e negativa nos grupos C e D. O tecido prostático de todos os animais apresentou marcação positiva (+++) para a PAP na parte apical do citoplasma das células epiteliais. A CPSE apresentou maiores possibilidades de utilização clínica para avaliação da próstata canina, devendo-se investigar melhor sua atividade diante de afecções prostáticas distintas.

Palavras – chave: diagnóstico, histopatologia, imunoistoquímica, PCR, próstata.

GENE EXPRESSION AND IMUNOHISTOCHEMISTRY OF CANINE PROSTATE SPECIFIC ESTERASE (CPSE), PROSTATIC ACID PHOSPHATASE (PAP) AND PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN (PSA) IN DOGS.

Summary – Forty seven intact male dogs were divided in three groups according to the age: young adults dogs (A group), middle aged dogs (B group) and old dogs (C group). Ten animals with prostatic alterations noted in ultrasonographic exam had been grouped separately (D group). The animals were submitted to euthanasia, transrectal ultrasonography and prostate gland extirpation. Samples were collected to histopathology, immunohistochemistry and reverse transcriptase and polymerase chain reaction (RT-PCR). The histopathological exam revealed that all samples from B, C and D groups had a prostatic affection in which benign prostatic hyperplasia (BPH) associated to non-bacterial prostatitis was more often. The RT-PCR was performed to evaluate CPSE, PAP and PSA expression, the results showed positive amplification of all samples to CPSE and PAP, but not to PSA. No difference was found between the amplicons quantity of CPSE to A, B and C groups, but this quantity was higher in D group. There was no statistic difference between the amplicons levels of PAP among the groups. Non correlation was found between CPSE amplicons levels and PAP, neither between these quantities and prostatic dimensions obtained by ultrasonography. The immunoreactions was weak and little extensive (++) in prostatic tissue of animals from A and B groups to PSA and the staining was negative in samples from C and D groups. All samples presented positive staining (+++) to PAP in apical cell surface of the prostatic epithelium. CPSE was better than PAP and PSA for canine prostate diagnosis Further more researches are needed to assess the activity of CPSE in different pathology of canine prostate.

Key words: diagnosis, histopathology, immunohistochemistry, PCR, prostate.

I. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer prostático e de hiperplasia prostática benigna é alta entre homens e, em alguns países, é a neoplasia que causa mais óbitos à população masculina. A ocorrência de óbitos deve-se principalmente ao diagnóstico tardio e tratamento ineficaz. Em virtude disso, tem aumentado nos últimos anos estudos sobre a fisiologia e patologia da próstata e, principalmente, métodos de diagnóstico que possam detectar precocemente alterações prostáticas.

Um dos grandes avanços no diagnóstico dessas alterações foi a descoberta de proteínas que funcionam como marcadores teciduais capazes de indicar modificações no tecido prostático. A mensuração da atividade dessas proteínas propicia excelente parâmetro para avaliação precoce da próstata e para estabelecer o tratamento e prognóstico adequados em casos de afecções da glândula. Métodos mais eficientes de mensuração dessas enzimas têm sido avaliados, dentre estes têm se destacado a imunoistoquímica e a avaliação molecular, por meio da expressão gênica, que tem fornecido informações mais precisas sobre a atividade desses marcadores e sua correlação com as alterações prostáticas.

O cão é a única espécie doméstica que desenvolve espontaneamente o câncer e a hiperplasia prostática benigna, com características similares às observadas em homens. Embora existam diversos estudos sobre a próstata canina, utilizando-a como modelo para estudo de alterações em humanos, muito ainda há para se esclarecer, principalmente no que se refere à regulação e atividade das enzimas prostáticas.

Em virtude dos resultados controversos sobre a utilização de glicoproteínas prostáticas para diagnóstico de afecções dessa glândula em cães e da ausência de um marcador tecidual, que efetivamente possa ser usado para avaliar a próstata canina, é que se objetivou nesse estudo verificar a expressão da

fosfatase ácida prostática (PAP), antígeno específico da próstata (PSA) e antígeno específico da próstata canina (CPSE) no tecido prostático de animais saudáveis em diferentes faixas etárias e com alterações prostáticas.

II. REVISÃO DE LITERATURA

No sistema reprodutor masculino da espécie canina, a próstata é a única glândula sexual acessória. É órgão bilobulado com septo mediano na superfície dorsal e está localizado no espaço retroperitoneal, ventral ao reto, dorsal à sínfise pubiana e caudal à bexiga, envolvendo a uretra proximal. A função da próstata é produzir e secretar líquido prostático como meio de transporte e suporte para os espermatozoides durante a ejaculação (BARSANTI & FINCO, 1992).

Histologicamente, a próstata se compõe de ácinos glandulares sustentados por um estroma de tecido conjuntivo e musculatura lisa, envoltos por uma cápsula fibrosa muscular espessa (COTRAN et al., 2000). O epitélio glandular colunar muda para transicional nos ductos excretórios que se abrem no interior da uretra. No parênquima prostático as células são de dois tipos, epitelial e estromal. As células epiteliais são colunares altas, com função secretória e basais, precursoras de epitélio secretório. As células estromais compreendem os fibroblastos e células musculares lisas envolvidas em tecido colagenoso, vasos sanguíneos e nervos (OLSON et al., 1987; BARSANTI & FINCO, 1992).

A glândula prostática existe em todos os mamíferos sendo mais importante no homem e no cão devido à frequência de afecções que acometem essas espécies. A próstata canina é considerada um dos melhores modelos experimentais e naturais para o estudo da próstata em humanos, pois o cão é a única espécie doméstica, que similarmente ao homem desenvolve espontaneamente hiperplasia prostática benigna e adenocarcinoma prostático. Essas alterações, no cão, parecem ter características similares às observadas em humanos (LEAV & LING, 1968; LOWSETH et al., 1990; WATERS & BOSTIWICK, 1997; WATERS et al., 1997).

As enfermidades prostáticas são comuns em cães idosos e não castrados, sendo mais comumente observadas a hiperplasia prostática benigna, prostatite bacteriana, cistos prostáticos, abscessos e metaplasia escamosa. Neoplasias não

são comuns, mas podem acometer, sobretudo, cães idosos (BARSANTI & FINCO, 1992; KRAWIEC & HEFLIN, 1992; KRAWIEC, 1994). Embora, essas alterações estejam caracterizadas como afecções particulares, podem ocorrer simultaneamente e os sinais clínicos por elas desencadeados são semelhantes, tornando difícil o diagnóstico definitivo.

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é provavelmente a anormalidade mais comum em cães adultos acima de três anos de idade, não orquiectomizados. Entretanto, pode ser observada em alguns cães já a partir de um ano de idade, embora a prevalência aumente linearmente com o passar dos anos, de modo que aos 6 anos de idade 60% dos cães são afetados e aos 9 anos 95% dos cães apresentam HPB (KLAUSNER et al., 1994). Essa afecção refere-se ao aumento do tamanho (hipertrofia) ou número de células (hiperplasia), caracterizando-se pelo maior volume de elementos prostáticos glandulares, pela diminuição na função secretória, incremento da vascularização e da inflamação intersticial (CHEW, 1997).

A HPB caracteriza-se histologicamente pela presença de projeções papilares para o lúmen em uma única camada com a membrana basal intacta, sendo observados ácinos císticos irregulares, rodeados por epitélio atrófico (ARANTES & FERREIRA, 2002). MOURA (2004) observou ainda infiltrado inflamatório mononuclear intersticial periacinar em meio à HPB e uma relação entre idade e tipo histológico de HPB com cães jovens, adultos e idosos apresentando os tipos epitelial, complexo e estromal, respectivamente.

Segundo KLAUSNER et al. (1994), a HPB canina ocorre em duas fases, uma glandular que acomete animais com menos de 5 anos e outra complexa que ocorre naqueles com mais de 5 anos. A hiperplasia glandular é caracterizada pelo aumento simétrico da próstata e do número e tamanho das células secretórias, sendo a proliferação primariamente epitelial, com pouco envolvimento estromal. A hiperplasia glandular complexa é caracterizada pelo aumento assimétrico da glândula, com áreas de atrofia. Os alvéolos podem estar dilatados, císticos e cheios de material eosinofílico.

A hiperplasia prostática benigna e outras condições que alterem a arquitetura normal da glândula prostática (metaplasia, neoplasia ou cistos) predispõem à infecção por interferirem com as defesas normais do organismo ou por promoverem um meio ideal para o crescimento de microorganismos. A prostatite é uma afecção muito comum em cães, principalmente adultos e idosos (DI SANTIS et al., 2001). A infecção geralmente resulta da ascensão de bactérias a partir da uretra, porém a contaminação hematógena e a disseminação de infecção da bexiga urinária e sêmen são possíveis (LING et al., 1990; RUBIN, 1990; BARSANTI, 1998; JOHNSTON et al., 2000). A próstata de cães normais possui mecanismos de defesa contra a migração ascendente de bactérias da uretra. Entre eles o fluxo urinário, peristalse uretral, produção local de imunoglobulina A e produção de fator antibacteriano prostático (FAP), que parece conter zinco e ser eficaz, principalmente, contra microorganismos entéricos gram-negativos (OLSON et al., 1987; BARSANTI & FINCO, 1992). Entretanto, a concentração de FAP diminui, nos cães, após quatro anos de idade, predispondo o animal a infecções e perda de fertilidade. Dessa maneira os animais idosos são acometidos por prostatite bacteriana com mais frequência (ARANTES & FERREIRA, 2002).

A infecção prostática pode ser aguda ou crônica, sendo a última mais comum. A prostatite aguda caracteriza-se por exsudato purulento no interior do lúmen glandular, podendo haver infiltração de linfócitos, plasmócitos e macrófagos no estroma. A forma crônica pode ser consequência do processo agudo ou aparecer de forma insidiosa. Os ácinos tendem a estar atróficos e focos de metaplasia escamosa podem estar presentes: o lúmen glandular contém variável quantidade de macrófagos, debris celulares e neutrófilos e o estroma adjacente, quase sempre, apresenta agregados de linfócitos e plasmócitos (DI SANTIS et al., 2001).

Entre as neoplasias que afetam a próstata canina o adenocarcinoma prostático é o mais freqüente, mesmo assim sua incidência é baixa (DI SANTIS et al., 2001; ARANTES & FERREIRA, 2002; MOURA, 2004). Pode ser observado

ainda carcinoma das células de transição, carcinoma das células escamosas, leiomiossarcoma e fibrossarcoma. A prevalência relatada em necrópsias foi de 0,2 a 0,6% (BELL et al. 1991).

A avaliação histopatológica sugere que o processo neoplásico surge de lesões pré-malignas, como as metaplasias e displasias, onde as células sofrem alterações substanciais, diferenciando-as das normais. Essas alterações envolvem mutações de genes que controlam o crescimento celular, permitindo que as células mutantes e suas descendentes proliferem (WEINBERG, 1996).

A fase pré-maligna do adenocarcinoma na próstata humana corresponde à displasia ducto-acinar ou neoplasia intra-epitelial prostática (NIP)(BOSTWICK, 1995). Foi observada uma incidência de 55% de casos de NIP de alto grau em cães idosos e não castrados, sem evidências clínicas de câncer (WATERS & BOSTWICK, 1997). Em humanos, a NIP é considerada como principal precursora do câncer de próstata. Está presente vários anos antes do surgimento do câncer e é encontrada em 82 a 100% dos carcinomas periféricos (ALGABA, 1997).

Em cerca de um terço dos casos, a NIP evolui para câncer invasivo dentro de um período de dez anos, supostamente após alterações genéticas adicionais terem se acumulado (COTRAN et al., 2000). Os achados histológicos dessa afecção incluem a ruptura da camada de células basais, aumento da capacidade proliferativa e da densidade capilar, sugerindo que a NIP em fase avançada corresponda a um estágio intermediário na progressão de alteração benigna epitelial para carcinoma (WATERS & BOSTWICK, 1997). Sendo assim, a observação precoce da NIP pode permitir o tratamento e evitar a progressão dessa alteração até o câncer.

O câncer prostático em cães é clinicamente agressivo e altamente invasivo, provocando metástases pelos linfonodos ilíacos externos e internos ou plexos venosos, vertebral e sistêmico, para as vértebras e pulmões. Pode ainda expandir, invadindo bexiga e ureteres, assim como a musculatura da pelve e do cólon. É possível a ocorrência de metástase também para o coração, rins, mesentério e epíplon (DI SANTIS et al., 2001). O prognóstico ruim associado ao câncer

prostático canino pode, em parte, ser atribuído ao diagnóstico tardio da afecção (WATERS & BOSTWICK, 1997; SERAKIDES et al., 1997).

O adenocarcinoma prostático é a neoplasia prostática mais comum em seres humanos e nos cães. Nessas espécies, afeta indivíduos de meia idade a idosos, sendo que nos cães parece haver uma ocorrência maior de casos em animais de médio à grande porte (SWINNEY, 1998). Alguns autores sugerem que a grande maioria dos casos ocorre em cães a partir de 8 anos de idade, em média de 8,9 anos (LEAV & LING, 1968; KRAWIECK & HEFLIN, 1992). Na espécie humana a neoplasia prostática também é considerada uma doença senil, sendo a *causa mortis* de mais de 50% dos homens acima de 70 anos (ARMBRUSTER, 1993). A similaridade na patogenia do câncer prostático entre cães e humanos têm tornado a espécie canina modelo natural para estudo dessa patologia, apesar de neoplasias prostáticas não serem tão comuns em cães como o são no homem, mas é lesão extremamente rara em qualquer outra espécie animal (LOWSETH et al., 1990; KARR et al., 1995).

2.1. Diagnóstico de afecções prostáticas

A incidência crescente de patologias de próstata, as ocorrências de várias patologias associadas e as grandes similaridades de sintomas clínicos reforçam a necessidade de métodos diagnósticos mais acurados para identificar qual o processo específico, propiciando um prognóstico seguro e uma conduta terapêutica mais precisa (ARANTES & FERREIRA, 2002).

2.1.1 Ultra-sonografia

Devido à facilidade de execução, o exame ecográfico da próstata é importante complemento diagnóstico no curso de alterações nesse órgão. A ultra-sonografia é procedimento seguro, não invasivo que pode ser utilizado não somente para caracterizar o tamanho e o contorno prostático, mas também o

parênquima glandular e estruturas com fluidos em seu interior (CARTEE & ROWLES, 1983). O principal valor da ultra-sonografia é a caracterização do tecido prostático, mas a distinção de doenças prostáticas não é possível somente com uso do ultra-som (FEENEY et al., 1987; KAY et al., 1989).

A ultra-sonografia transretal é um método mais aprimorado para avaliação da próstata devido à maior proximidade entre o transdutor e a glândula, superando inclusive à dificuldade de visualização desse órgão nos animais em que sua localização é pélvica e a sínfise púbica dificulta o acesso (JUNIEWICZ et al., 1989b; ATALAN et al., 1999).

Em cães existem limitações que inviabilizam o uso rotineiro desse procedimento em clínicas veterinárias, como a variação no tamanho dos animais que exigem sondas de diversos diâmetros e a necessidade de tranquilizar o animal para execução do exame (MUZZI et al., 1999).

A glândula prostática pode ser mensurada com maior segurança pelo exame ultra-sonográfico do que pela radiografia (JUNIEWICZ et al., 1989a). CARTEE & ROWLES (1983) determinaram as dimensões médias craniocaudais (CC) e ventrodorsais (VD) como sendo, respectivamente, 2,2 e 2,3 cm em animais de 2 a 4 anos. RUEL et al. (1998) encontraram dimensões prostáticas CC e VD médias, em cães saudáveis com 5 anos de idade, de 3,4 e 2,8 cm, respectivamente. Verificaram, ainda, correlações positivas entre essas medidas e a idade e peso corpóreo dos animais. Enquanto SOUZA (1998) obteve dimensões craniocaudais e ventrodorsais de 3,7 ($\pm 1,0$) cm x 2,8 ($\pm 0,8$) cm para animais de 1 a 3 anos; 4,1 ($\pm 1,3$) cm x 3,1 ($\pm 1,0$) cm para o grupo de 4 a 6 anos e 4,4 ($\pm 1,6$) cm x 3,2 ($\pm 1,7$) para animais de 7 a 11 anos. BURK & ACKERMAN (1996) afirmaram que um cão com médio porte (15 a 25 kg) possui próstata com diâmetro de 1,5 a 3 cm. Segundo ATALAN et al. (1999), o comprimento e a largura prostática são os melhores parâmetros para avaliar o tamanho da próstata no cão. Enquanto YIP et al. (1991) observaram que a espessura é a melhor medida para avaliar o tamanho prostático no homem.

O exame ultra-sonográfico pode prover importante informação diagnóstica na evolução das alterações prostáticas. Muitas doenças prostáticas estão associadas com a prostatomegalia e assim, a estimativa do tamanho pode ser importante na avaliação de cães com afecções nesse órgão (RUEL et al., 1998).

2.1.2 Marcadores teciduais da próstata

A alta incidência de malignidade prostática tem aumentado o uso de marcadores teciduais para a detecção do câncer (ALIVIZATOS et al., 1992). Antígenos específicos teciduais ou antígenos de diferenciação estão presentes na superfície de células normais e são característicos de um determinado estado de diferenciação desses tecidos. Clinicamente, esses antígenos apresentam significado no diagnóstico de alterações no tecido de origem e na imunoterapia (SOUZA & TONIOLO, 2001). Marcadores que refletem a atividade biológica do tumor podem ser de substancial importância para ajudar a decidir quão agressivo deva ser um tratamento (LEWENHAUPT et al., 1990).

Em humanos, a detecção de níveis séricos elevados de glicoproteínas prostáticas, especialmente antígeno específico prostático (PSA) e fosfatase ácida prostática (PAP) tem grande valor para o diagnóstico de doenças da próstata.

A PAP humana é um antígeno de diferenciação específico do epitélio prostático e funciona como uma proteína-tirosina fosfatase neutra, envolvida na regulação do crescimento celular prostático (ZELIVIANSKI et al., 2002). É sintetizada no epitélio secretório prostático e secretada no lume acinar por mecanismo merócrino e apócrino, sob controle androgênico.

A PAP e o PSA têm suas concentrações séricas elevadas em casos de HPB e a PAP em outras doenças não prostáticas (ALIVIZATOS et al., 1992). A avaliação da PAP tem sido substituída pela do PSA, na detecção do câncer prostático humano. O uso da mensuração da PAP em soro humano tem sido restrito ao monitoramento do tratamento instituído e à avaliação prognóstica (LEWENHAUPT et al., 1990), mas pode ser útil no diagnóstico de

adenocarcinomas em crescimento ativo e indicar presença de metástases (AMORIM et al., 2004).

Nos cães, a PAP atinge concentrações séricas capazes de serem detectadas através de reagentes comerciais humanos, enquanto o PSA não (SOUZA, 1998). Apesar dos estudos de McENTEE et al. (1987) esclarecerem a possibilidade de utilização do teste humano para dosagem de PSA no cão, a produção do PSA na próstata canina ainda é controversa. Considerando que sua função é de catalisar outra proteína produzida pela vesícula seminal, que aglutina o sêmen humano, supõe-se que o cão não a produza por não possuir vesícula seminal (SOUZA, 1998).

Como na próstata humana, a secreção de PAP no cão é dependente de hormônio e mostra considerável variação com a idade. As alterações quantitativas são menos pronunciadas na próstata desses animais, porque a concentração dessa enzima é menor do que na glândula humana. Métodos imunoistoquímicos e de microscopia imunoelétrica demonstraram que a enzima é um marcador altamente sensível da integridade estrutural das células secretórias na glândula prostática canina (AUMÜLLER et al., 1987; SOUZA & TONOLLO, 2001).

Estudos como o de CORAZZA et al. (1994) têm demonstrado resultados promissores na utilização da PAP como marcador bioquímico de adenocarcinoma canino pelo significado clínico no diagnóstico precoce do tumor local, na diferenciação entre adenocarcinoma prostático e HPB e no acompanhamento da eficácia terapêutica contra o câncer. Os resultados obtidos demonstraram que, nos machos normais, a concentração sérica da PAP aumentou significativamente com a idade. Cães que apresentavam HPB demonstraram menor elevação nos níveis séricos médios de PAP do que cães que apresentavam adenocarcinoma prostático. SOUZA (1998) encontrou valores de PAP diferentes para cães em diferentes faixas etárias, em que estes apresentavam concentrações decrescentes de PAP à medida que a idade avançava.

De acordo com GOBELLO et al. (2002), a atividade sérica e seminal da PAP não difere significativamente entre cães normais e aqueles com doenças

prostáticas ou entre cães com diferentes alterações de próstata. O adenocarcinoma prostático parece não estar associado com aumento significativo na atividade da PAP. Seria necessário que estivesse excessivamente elevado nas células tumorais e metástases para ser considerado marcador útil. Sendo assim, os autores sugeriram que mais experimentos seriam necessários para definir a PAP como marcador prostático do sêmen canino. O mesmo foi verificado por GADELHA (2003) em estudo prévio observando que as concentrações séricas e seminais de PAP não variaram em relação à idade, nem foram diferentes em cães com indícios de hiperplasia prostática benigna. Entretanto, as concentrações dessa enzima foram maiores no plasma seminal do que no soro, confirmando sua origem prostática.

Desde a identificação do PSA, avanços tecnológicos contínuos têm propiciado o desenvolvimento de ensaios altamente sensíveis para sua quantificação. Ele não parece ser o marcador tumoral perfeito, dado sua pouca especificidade para neoplasia prostática e sua detecção em níveis baixos em tecidos não prostáticos. Entretanto, é o mais útil marcador para monitorar a progressão e a resposta ao tratamento entre os pacientes com câncer de próstata (ABLIN, 1997). De acordo com ALIVIZATOS et al. (1992) a especificidade da PAP é maior do que a do PSA, enquanto que o PSA apresenta maior sensibilidade.

O PSA é uma proteína de massa molecular de 33-34 kDa e uma cadeia simples de 240 aminoácidos, encontrada no sêmen humano e utilizada em exames forenses (ARMBRUSTER, 1993; ABLIN, 1997). Faz parte da família das calicreínas, muitas das quais são expressas em concentrações altas na próstata (LILJA, 2003; DE ANGELIS et al., 2007).

Essa enzima é secretada pelas células epiteliais prostáticas, liberada no lúmen dos ductos prostáticos, tornando-se um componente do plasma seminal. No fluido seminal a função do PSA é clivar proteínas coaguladoras liberadas pela vesícula seminal (seminogelinas I e II e fibronectina), liquefazendo o ejaculado, aumentando a motilidade dos espermatozóides e auxiliando a fertilização. Recentemente, estudos têm demonstrado que o PSA parece estar envolvido na

regulação do crescimento tumoral, exercendo uma função protetora do tecido por diminuir a expressão de fatores pro-angiogênicos. A administração de PSA livre em ratos, inoculados com linhagens de células neoplásicas, demonstrou que o crescimento tumoral foi suprimido pela diminuição da expressão de genes de fatores pro-angiogênicos e aumento da expressão de genes para fatores anti-angiogênicos (BINDUKUMAR et al., 2005).

PAPSIDERO et al. (1980) relataram a identificação do PSA no soro de pacientes possibilitando sua aplicação clínica. A maior parte do PSA que alcança a circulação sistêmica é derivada do epitélio prostático que sofreu apoptose. Essas células lisadas liberam PSA no componente intersticial, chegando à circulação sistêmica, apesar da barreira composta pelas células basais acinares e ductais (MONTINORI et al., 2000). Essa barreira torna-se mais frágil nos casos de câncer e de HPB, por isso esta proteína pode estar elevada nestes grupos de pacientes (OESTERLING, 1991; HAKALAHTI et al. 1993).

Muitos estudos enfatizam a utilidade clínica do PSA em pacientes com câncer prostático, especialmente quando associada a outros parâmetros como grau de diferenciação do tumor, alterações perceptíveis à ultra-sonografia e palpação retal. A mais importante variável no aumento dos níveis de PSA sérico é a prostatomegalia. Os níveis de PSA parecem estar correlacionados com a idade do indivíduo e o volume prostático (ARMBRUSTER, 1993; PLOCH & BRAWER, 1994), de forma que a mensuração do volume prostático por ultra-sonografia associada aos níveis séricos de PSA pode prover informações para diagnóstico mais criterioso de neoplasia (PLOCH & BRAWER, 1994; ABLIN, 1997).

A rotineira utilização do PSA como marcador tecidual em humanos suscitou estudos para sua detecção em outros animais. KARR et al. (1995), utilizando análise por "Southern blot", detectaram genes relacionados ao PSA humano em primatas, mas não em outros mamíferos, incluindo coelhos, bovinos, suínos, caninos, ratos e camundongos. O mesmo resultado foi obtido por AGGARWAL et al. (2006) que não detectaram nenhuma quantidade de RNAm para PSA no tecido prostático de ratos e cães, utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase) em

tempo real. Entretanto, uma protease secretada pela próstata canina denominada esterase específica da próstata canina (CPSE) possui grande similaridade (58% de homologia aminoacídica) com o PSA (LEROY et al. 2004).

A esterase específica da próstata canina parece pertencer à família gênica das calicreínas, é dependente de andrógenos e representa mais de 90% das proteínas totais do líquido seminal do cão (CHAPDELAINE et al., 1988; JOHNSTON et al., 2001; GOBELLO et al. 2002). O substrato fisiológico da CPSE é ainda desconhecido, bem como sua função. O cão não possui vesícula seminal, tampouco apresenta formação de coágulo seminal, portanto sua função parece ser diferente de seu homólogo PSA (CHAPDELAINE et al., 1988).

BELL et al. (1995) avaliaram a concentração sérica de diferentes glicoproteínas prostáticas no cão e não detectaram PSA sérico ou seminal. Já a CPSE estava significativamente aumentada nos casos de HPB em relação aos cães saudáveis. No entanto, ela também estava elevada em outros tipos de afecção prostática. Por outro lado, MOURA et al. (2006) verificaram presença de PSA no soro e urina de cães com HPB, utilizando ensaios por quimioluminescência, em níveis muito mais baixos do que os observados em humanos. Esses autores não descartam a possibilidade de ter ocorrido reação cruzada para a CPSE, dada a semelhança bioquímica entre as duas glicoproteínas.

2.1.3. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O entendimento dos processos envolvidos na carcinogênese teve um progresso muito rápido nas últimas décadas, principalmente graças ao desenvolvimento de técnicas que permitiram a manipulação do material genético. Em pouco tempo, os processos de extração de ácidos nucleicos tornaram-se de uso corrente e a amplificação de seus segmentos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu o uso de amostras com uma quantidade muito pequena

de material. Com isso, foi possível identificar marcadores específicos associados ao processo neoplásico.

A PCR é um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente seqüências específicas de DNA utilizando pequenos oligonucleotídeos de 18 a 25 bases que se ligam a determinadas regiões de interesse do genoma, denominados “primers” ou iniciadores. O procedimento consiste de uma série de ciclos repetidos de amplificação. Os produtos sintetizados servem como moléculas-molde no próximo ciclo, duplicando o número de moléculas a cada ciclo, criando uma reação em cadeia. Após 20 ciclos, a amplificação é de aproximadamente 10^6 a 10^8 . Essa amplificação pode ser obtida também utilizando o RNA como material iniciador. Esse procedimento, denominado RT-PCR, é realizado por meio da reação de transcrição reversa, seguida de PCR convencional no cDNA (SAIKI, 1992).

Em virtude de sua alta sensibilidade e potencial diagnóstico, a técnica de RT-PCR tem sido usada para detectar células neoplásicas circulantes a partir de tumores sólidos utilizando marcadores teciduais. Para o câncer de próstata humano, o principal marcador é o PSA. A quantificação aplicada à RT-PCR tem sido uma técnica eficiente para analisar quantidades muito pequenas de RNAm de células e tecidos, propiciando detecção sensível e quantitativa da expressão gênica (YLIKOSKI et al., 1999).

Estudos de expressão gênica de PAP e PSA em próstatas de homens com HPB e câncer, demonstraram que a expressão dessas enzimas está mais baixa nos tecidos com câncer do que nos que apresentavam hiperplasia, havendo discreta correlação entre a expressão de PAP e PSA nas amostras de câncer, sugerindo similaridade na regulação desses genes. A expressão desses marcadores parece estar sob controle complexo de andrógenos, fatores de crescimentos e quinases celulares que parecem influenciar a taxa de transcrição nesse tecido (HAKALAHTI et al., 1993).

Marcadores úteis para identificação de tecido prostático em humanos, como PSA e PAP, têm resultados variáveis quando aplicados à próstata canina. Segundo LEROY et al. (2004), a CPSE é expressa no tecido prostático normal de

cães, apresentando quantidades altas de RNAm, enquanto que a expressão em tecido com carcinoma primário é 10 a 15% menor. Os andrógenos regulam as concentrações de RNAm para CPSE principalmente na fase transcricional e essa regulação parece ser feita por um mecanismo diferente daquele efetuado sobre o PSA e a calicreína 2 (hK2). O elemento de resposta ao andrógeno tem cem vezes mais afinidade pelo PSA do que pela CPSE (DUBÉ et al., 1995). Ainda não se sabe se a CPSE é parte do grupo das calicreínas já que ela não libera quininas como é observado em todas as proteínas dessa família. CHAPDELEINE et al. (1988), em experimentos com hibridização em “Southern blot”, não encontraram genes homólogos à CPSE.

2.1.4. Imunoistoquímica

A imunoistoquímica (IHQ), ao combinar técnicas anatômicas, imunológicas e bioquímicas, permite localizar componentes tissulares *in situ* mediante o emprego de anticorpos específicos e moléculas marcadoras (GIMENO, 1995). Os exames imunoistoquímicos estão cada vez mais sendo utilizados na rotina diagnóstica, devido à necessidade de diagnósticos mais precisos para determinar tratamento e prognóstico mais eficientes e a um número crescente de anticorpos disponíveis para uso em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina (BARRA, 2006).

O PSA e a PAP têm sido utilizados para a avaliação imunoistoquímica das células epiteliais prostáticas em humanos e cães. O PSA mostrou 98% de reatividade com anticorpos em células com metástases de adenocarcinoma prostático humano, enquanto a PAP foi positiva em apenas 77% dos casos, demonstrando a maior sensibilidade e especificidade do primeiro marcador tecidual. A IHQ é importante para confirmar a origem prostática de neoplasias na glândula, quando o diagnóstico diferencial inclui outros tumores não prostáticos como o carcinoma urotelial da bexiga (HAMEED & HUMPHREY, 2005; CHUANG et al., 2007; SHERIDAN et al., 2007). A sensibilidade e especificidade da

expressão de PSA na próstata humana testadas por IHQ mostraram que os anticorpos monoclonais são mais específicos e importantes para diagnóstico diferencial (VARMA et al., 2002).

Segundo NARITOKU & TAYLOR (1982) a reação com o anti-PAP ocorreu no citoplasma das células epiteliais prostáticas, mais especificamente no ápice das células, sendo a coloração mais intensa nos tecidos normais e hiperplásicos quando comparados ao tecido neoplásico. O estroma e os elementos vasculares não reagiram com o anticorpo. Comparando a reação da próstata humana com a da próstata canina, esses autores verificaram que o tecido prostático canino foi positivo para reação com anticorpos policlonais, mas foi negativo quando se utilizou anticorpos monoclonais desenvolvidos para próstata humana.

AUMÜLLER et al. (1987) observaram que o padrão de distribuição e intensidade da coloração de imunorreatividade da PAP na glândula canina é similar à observada no humano e que as células secretoras se coram preferencialmente na porção apical, com o epitélio cúbico corando mais intensamente do que o epitélio colunar que reveste as projeções papilares do ácino.

Em estudos de próstata de cães com tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, utilizando os marcadores imunológicos para PSA, PAP e CPSE, demonstrou-se que glândulas normais e hiperplásicas apresentaram boa marcação com os anticorpos. O CPSE foi o que produziu coloração mais uniforme e difusa, enquanto que o PSA e PAP marcaram células acinares individuais com variada intensidade. Entretanto, a sensibilidade do CPSE como marcador foi mais baixa do que a do PSA e PAP. Esses mesmos estudos verificaram que células epiteliais ductulares da próstata de cães jovens orquiectomizados foram negativas, bem como o epitélio de glândulas císticas e áreas com inflamação crônica. Nos tumores bem diferenciados a marcação para os três reagentes foi forte e em tecidos não prostáticos não foi detectada reação para o PSA e CPSE, mas houve reação para a PAP (McENTEE et al., 1987).

MOURA (2004) encontrou níveis de PSA sérico maior nos animais com hiperplasia epitelial e, de modo geral, em todos com os demais tipos de HPB. As concentrações séricas de PAP foram maiores nos grupos de cães com HPB, sendo todas estas variáveis representativas do perfil histológico da glândula. Ao exame histológico, a maioria das próstatas de cães acima de três anos (85%) apresentou alguma alteração histomorfológica, sendo freqüente a ocorrência de duas ou mais simultaneamente. Neste mesmo ensaio, as reações imunoistoquímicas de PSA e PAP foram 100% positivas e uniformes em próstatas com histologia normal e variaram em número de células marcadas e intensidade nas com HPB.

Em estudo prévio (SHARIAT et al., 2003) no qual se comparou a IHQ e a RT-PCR, verificou-se que a RT-PCR parece ser um método mais sensível e acurado para estimar a progressão da doença, metástases e sobrevida dos pacientes por detectar 10 vezes mais resultados positivos do que a imunoistoquímica, mas a IHQ mostrou alta especificidade, além de fornecer informações citomorfológicas sobre o tecido afetado.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e local de execução do experimento

Quarenta e sete cães, machos, sem raça definida, de porte médio e não castrados foram selecionados de acordo com aspecto clínico e divididos em grupos de acordo com a faixa etária estimada sendo:

- 11 animais adultos jovens (1 a 3 anos de idade) sem sinais clínicos ou ultra-sonográficos de doença prostática (grupo A),
- 14 animais de meia idade (4 a 6 anos) sem sinais clínicos ou ultra-sonográficos de doença prostática (grupo B) e
- 12 animais idosos (a partir de 7 anos de idade) sem sinais clínicos ou ultra-sonográficos de doença prostática (grupo C).

Dez animais com alterações no parênquima prostático visíveis à ultra-sonografia foram agrupados separadamente (grupo D), independentemente da idade.

Os animais utilizados nessa pesquisa pertenciam ao Programa “SOS ao cão” do Centro de Controle de Zoonoses (Fortaleza, CE) e foram submetidos ao exame físico ao qual se incluiu o toque retal da próstata. Após a eutanásia dos cães, estes foram pesados e procedeu-se o exame ultra-sonográfico (Aparelho de ultra-sonografia Aloka SSD 500), para visualização e mensuração da próstata e a colheita de amostras. A eutanásia é utilizada nesta instituição para controle populacional e prevenção de zoonoses e epidemias (Apêndice 1). O procedimento é realizado aplicando-se inicialmente uma dose sedativa de quetamina associada à xilazina (15 mg/Kg de quetamina e 1 mg/kg de xilazina) por via intra-muscular e, após a sedação do animal, aplica-se cloreto de potássio intra-cardíaco.

3.2. Ultra-sonografia

O exame ultra-sonográfico foi realizado em tempo real, com transdutor setorial de 5,0 e 7,5 MHz por via transretal, procurando evidenciar as dimensões (craniocaudal e ventrodorsal), a ecogenicidade e presença de nódulos ou formações cavitárias na glândula prostática (Fig. 1).

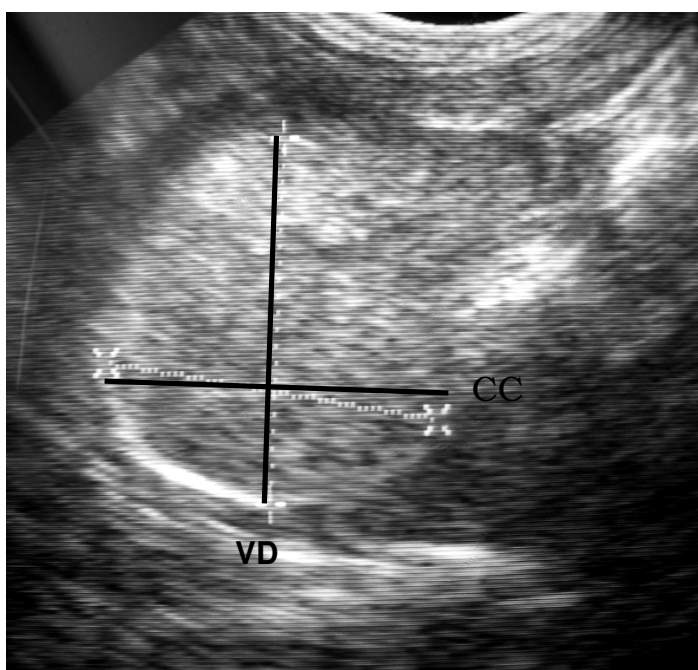


Figura 1. Mensuração das dimensões craniocaudal (CC) e ventrodorsal (VD), da próstata de cão, obtidas por ultra-sonografia.

A dimensão craniocaudal correspondeu à distância entre o pólo cranial e caudal, em corte longitudinal, seguindo o eixo da uretra. A dimensão ventrodorsal correspondeu à distância entre uma extremidade e outra perpendicular ao eixo da uretra.

Antes do procedimento os animais foram submetidos a jejum de oito horas e tiveram o reto esvaziado para não prejudicar a visibilização da glândula. A sonda transretal foi envolvida em filme plástico, lubrificada com gel acústico e cuidadosamente inserida no reto do animal.

Após a ultra-sonografia transretal, foi efetuada a excisão da próstata dos animais. A glândula obtida foi liberada do peritônio e do tecido adiposo que a envolvia e pesada em balança de precisão. Amostras foram colhidas e parte delas foi acondicionada em formol tamponado a 10% para exame histopatológico e imunoistoquímico e outra parte foi congelada em gelo seco e imediatamente acondicionada em freezer a 80° C negativos.

3.3. Histopatologia

Foram colhidas pelos menos três amostras de regiões diferentes da glândula (cranial, média e caudal). A confecção das lâminas foi realizada segundo a técnica rotineira de inclusão de tecido em parafina. Realizaram-se cortes de 5 µm de espessura em cada bloco de tecido que foram dispostos em lâminas previamente identificadas. A coloração utilizada foi a de hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram observadas por profissional veterinário no Laboratório Bio Ciência de Análises Clínicas, em Fortaleza – CE, por meio de microscópio óptico. Foram verificados três fragmentos de tecido por amostra para emissão do diagnóstico histopatológico.

3.4. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Todo procedimento, desde a extração do RNA, foi efetuado no Núcleo de Genômica e Bioinformática – Nugen, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE. O tecido foi descongelado à temperatura ambiente, cortado em fragmentos menores que foram macerados e banhados em TRIzol[®] (TRIzol reagent- Invitrogen) para maior liberação das células e

conservação do RNA. Em seguida, foi extraído o RNA, utilizando o procedimento de tiocianato de guanidina descrito por CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) (Apêndice 2).

As moléculas de RNA precipitadas foram submetidas à lavagem e solubilização para serem utilizadas na síntese de cDNA por meio da reação de transcrição reversa (Apêndice 4), utilizando enzimas (“kit” Super Script™ One Step RT-PCR Systems com Platinum Taq DNA Polymerase - Invitrogen) e “primers” específicos para a PAP, PSA e CPSE. Antes de a transcrição reversa ser efetuada, a quantidade de RNA extraído foi mensurada por espectrofotometria (Biomate 3 - Thermo Electro Corporation) para se estabelecer a quantidade de amostra de RNA a ser inserida na reação com a transcriptase reversa (Apêndice 3). Foi padronizada a quantidade de 5µg de RNA para cada reação, de modo que a quantidade em µL foi calculada seguindo essa premissa, para que a quantidade de RNA extraído interferisse o mínimo possível na quantidade de cDNA a ser sintetizada.

Os “primers” para as enzimas foram desenhados (programa computacional Primer 3) a partir de sequência gênica dessas enzimas no genoma canino encontradas no Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) sob identificação Y00751 (CPSE), XM 542782 (PAP) e XM 533980 (PSA). Foi confeccionado um “primer” para um gene constitutivo presente em quase todos os tecidos animais, utilizado em trabalho prévio e aplicado rotineiramente como controle positivo da reação.

Tabela 1. Seqüências de oligonucleotídeos (“primers”) utilizados na PCR para amplificação de cDNA das proteínas esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e antígeno específico da próstata (PSA) e o tamanho esperado do produto amplificado.

Proteínas	“Primers”	Produto Amplificado
CPSE	5' TAATTGTGAGGTCTGGCTGG 3' 5' TCCAAGACACCAGCACACAG 3'	399pb
PAP	5' TTGTGACGCTGGTGTTTAGG 3' 5' CTGGGATTCCAGATGCTGAT 3'	295pb
PSA	5' ATGCCTTCTCTCCACAAGGA 3' 5' TTGTAGGGCACTTGGAGACC 3'	499pb
PSA	5' CTGGGGTGAAGTCCTATCCA 3' 5' GTTTCCAGTGAAGCCAGGTC 3'	299pb
β -ACTINA	5' ACHAACTGGGAYGAYATGG 3' 5' TAGATGGGBACDGTGTGGG 3'	200pb

Em seguida foi efetuada a PCR para amplificar as amostras de cDNA obtidas, com uma reação para cada enzima (Termociclador Primus 96 plus MWG - Biotech), padronizando o programa para a CPSE em:

- 94°C por 4 minutos;
- 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação),
52°C por 1 minuto (anelamento) e
72°C por 1min (extensão)
- término da reação à 72°C por 10 minutos.

O mesmo programa foi empregado para os “primers” da β-actina, PAP e PSA mudando somente a temperatura de anelamento para 53°C, 58°C e 58°C, respectivamente. Os produtos da PCR foram depositados em gel de agarose a 1% (2 µL de amostra), contendo brometo de etídeo e em seguida o gel foi fotografado em aparelho de emissão de luz ultravioleta com câmera acoplada (Transiluminator SBTI-88- Fisher Scientific; PowerShot G6). A foto obtida foi editada (Photo Studio 4 – Arcsoft) e submetida à avaliação de intensidade das bandas por um “software”

(Image Aide 3.06.04 Analysis Software – Spectronics Corporation), sendo a intensidade descrita numericamente.

Para confirmar se o produto amplificado correspondia à enzima procurada, foi realizado o seqüenciamento (Seqüenciador Abi Prism® 3100 DNA Analyser-Applied Biosystems) e a seqüência obtida era comparada às seqüências disponíveis no Genbank por meio do programa computacional BLAST nucleotídeo “on line” (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O seqüenciador automático de DNA ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, dispõe de um sistema de 16 capilares que injetam uma carga eletrostática nas amostras, as quais migram através dos capilares de um pólo negativo até o pólo positivo localizado no final do capilar, encerrando a corrida eletroforética realizada em polímero POP Version 6 (Applied Biosystems®). Os capilares dispõem de uma janela de detecção acoplada a um sistema de laser e a uma câmera. O feixe de raios laser, ao passar pela janela atravessando os capilares, incita as bases marcadas que produzem um comprimento de onda característica de cada base específica (A, T, C e G).

O comprimento de onda é então detectado pela câmera que transmite a informação ao computador acoplado ao seqüenciador. Este computador dispõe de um software, Data Collection® (Applied Biosystems®), que controla as operações do seqüenciador, bem como coleta e interpreta os dados produzidos. Os resultados coletados são posteriormente analisados pelo “software” Sequence Analysis® (Applied Biosystems®) responsável pela produção de um eletroferograma, que é representativo da seqüência de bases detectadas nas amostras. O eletroferograma é visualizado pelo aplicativo Chromas. O tamanho do capilar utilizado neste trabalho foi o de 50cm que seqüencia até aproximadamente 500 bases por corrida.

Os dados foram posteriormente analisados pelo “software” Phred (“Base Calling Software with Quality Information”) com a finalidade de verificar a qualidade das seqüências. O programa Phred consiste num software livre, cuja característica principal é atribuir valores de qualidade (0-99) para cada nucleotídeo

através de algoritmos, que utilizam cálculos matemáticos para especificar a intensidade dos picos (altura e largura) gerados pelo eletroferograma. Além disso, ele realiza a edição das seqüências para remoção de bases de baixa qualidade e ambigüidades. Somente as seqüências que apresentaram alta qualidade, bases com um escore Phred acima de 20 (valor confiável), foram selecionadas para verificação dos produtos de PCR corresponderem a proteína buscada.

As seqüências obtidas foram então submetidas a um BLAST para certificação da identidade da enzima CPSE (10 amostras) e PAP (13 amostras).

3.5. Imunoistoquímica

O procedimento imunoistoquímico foi efetuado no laboratório do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC. O material obtido foi acondicionado em frasco plástico com solução tamponada de formol a 10% por 24h e depois em álcool 70% até o processamento para inclusão em parafina. A partir desse ponto, os blocos de inclusão passaram pelo processo de corte e técnica de imunoistoquímica utilizando o Complexo Streptoavidina-Biotina-Peroxidase com recuperação antigênica. Para tal, foram confeccionados cortes de tecido prostático com 5 µm de espessura que foram distendidos em lâminas histológicas previamente gelatinizadas, com o objetivo de promover melhor adesão dos cortes às lâminas. Em seguida, estas permaneceram em estufa durante 24 horas, com temperatura entre 55 e 58°C.

Subseqüentemente, as lâminas foram colocadas em cuba de vidro e diafanizadas em xilol, sendo realizados dois banhos de 5 minutos. Ainda nessa fase passaram por processo de desidratação com duas lavagens rápidas em álcool absoluto, um banho de cinco minutos em álcool 70% e um em álcool 50%. Depois, as lâminas foram lavadas em água corrente (10 minutos) e banhadas duas vezes em água destilada.

A recuperação antigênica foi efetuada com solução tampão de citrato 10mM e pH 6,0 e incubação em alta temperatura, utilizando forno microondas, em potência baixa, por 10 minutos. Após o arrefecimento das lâminas seguia-se a passagem em água corrente e duas passagens em água destilada. A fase de bloqueio da peroxidase endógena foi efetuada com incubação das lâminas em uma solução de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) 20 volumes e água destilada durante 20 minutos, com uma troca no intervalo de dez minutos, seguindo-se lavagem em água corrente, passagem em água destilada (duas vezes) e banho em solução salina tamponada (TBS) de Tris-NaCl por cinco minutos.

O bloqueio de proteínas inespecíficas foi efetuado banhando-se as lâminas em albumina sérica bovina a 2%, durante uma hora. Em seguida repetiu-se a lavagem em água corrente, passagem em água destilada e banho em TBS.

Os anticorpos primários anti-PSA (Dako N1550/monoclonal rato anti-psa humano) e anti-PAP (Dako N1518/policlonal coelho anti-PAP humana) foram utilizados prontamente. As amostras foram cobertas com estes anticorpos e incubadas em câmara úmida por 18 a 30 horas à temperatura de 4°C. Em seguida, as lâminas foram banhadas em TBS por cinco minutos (duas vezes), incubadas com anticorpo secundário biotinilado e solução de streptoavidina-biotina-peroxidase ("kit" LSAB-Dako K0690), por trinta minutos cada reação, em câmara úmida e à temperatura ambiente. Entre as duas reações e ao final da segunda, as lâminas permaneceram em TBS.

Para a revelação da reação, as lâminas foram incubadas em solução de diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos em local escuro e, após passagem em TBS, lavagem em água corrente e passagem em água destilada, foram desidratadas por meio de banhos em álcool 50%, 70%, absoluto (duas vezes) e xilol (duas vezes), sendo cada banho de três minutos. Ao final, os cortes foram cobertos com meio de montagem e lamínulas histológicas.

As lâminas foram analisadas por microscopia óptica e a extensão da marcação mensurada por avaliação semiquantitativa, atribuindo-se os escores definidos na tabela 2. Comparou-se ainda a intensidade da marcação das células entre os grupos de cães.

Tabela 2. Escores aplicados na análise da marcação imunoistoquímica.

Escore	Significado
-	Marcação ausente
+	Marcação positiva em 30% das células
++	Marcação positiva em 31 a 70% das células
+++	Marcação positiva em mais de 70% das células

3.6. Análise estatística

O delineamento experimental foi o Inteiramente casualizado, sendo que cada grupo representou um tratamento. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. Para essa análise, utilizou-se o procedimento PROC GLM do SAS versão 8.0 (2000). Foi realizada a análise de variância para as médias de cada variável, aplicando o teste de Tukey a um nível de significância de 5%. Foi realizado ainda o teste de correlação de Pearson entre as diferentes variáveis (SAS versão 8.0, 2000).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ultra-sonografia e histopatologia

Nesse estudo observou-se que a ultra-sonografia transretal foi de fácil execução e permitiu a mensuração das dimensões craniocaudal e ventrodorsal. A avaliação ecográfica do parênquima prostático permitiu a observação de lesões cavitárias (Fig. 2).

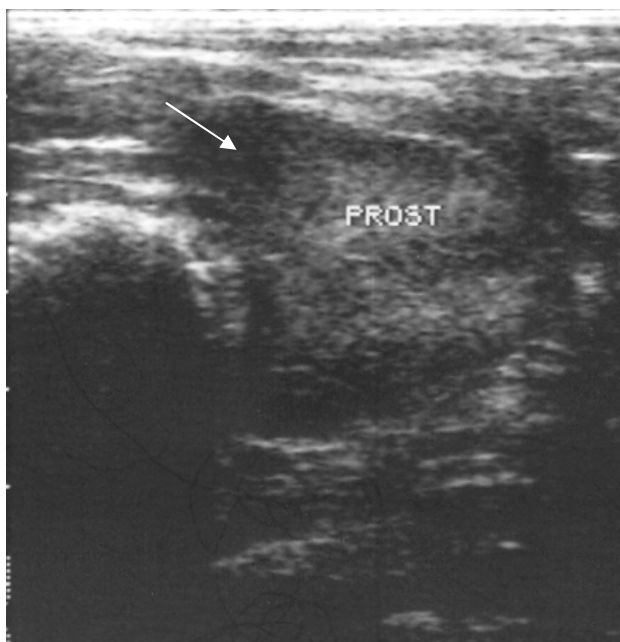


Figura 2. Imagem ultra-sonográfica da próstata de cão, via transretal, em tempo real, modo B, em plano sagital e frequência de 5 MHz, com lesão cavitária no parênquima prostático (seta).

As médias e desvios padrões do peso corpóreo (PC), dimensões craniocaudal (CC) e ventrodorsal (VD) obtidas por ultra-sonografia transretal e o peso da próstata nos diferentes grupos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Médias e desvios padrão das variáveis: peso corpóreo (PC), dimensões craniocaudais (CC) e ventrodorsais (VD) e peso da próstata (PP) de cães dos grupos A, B, C e D, Jaboticabal, 2008.

Grupos	PC (Kg)	CC (cm)	VD (cm)	PP (g)
A	11,28 ± 2,75	2,35 ± 0,52 ^b	1,98 ± 0,18 ^b	10,37 ± 4,34 ^b
B	14,84 ± 2,33	2,77 ± 0,41 ^b	1,94 ± 0,28 ^b	15,23 ± 5,83 ^b
C	14,58 ± 3,39	3,41 ± 0,58 ^a	2,29 ± 0,41 ^{ab}	20,63 ± 9,58 ^{ab}
D	14 ± 4,90	3,74 ± 0,54 ^a	2,56 ± 0,47 ^a	31,8 ± 14,09 ^a
CV %	22	17,02	15,87	45,84

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si; (p ≤ 0,05)

O peso dos animais não variou entre os grupos, demonstrando a homogeneidade da população estudada em relação ao peso. Para a dimensão craniocaudal, os grupos de animais idosos (C) e de animais com alterações no parênquima prostático (D) apresentaram valores significativamente maiores do que os animais jovens (grupo A) e de meia idade (grupo B). Os animais do grupo D apresentaram também dimensão ventrodorsal e peso da próstata maior do que os animais dos demais grupos.

A variação no tamanho da próstata de acordo com a idade dos animais já foi amplamente relatada na literatura (RUEL et al., 1998; LOWSETH et al., 1990; GADELHA, 2003). Houve correlação do peso corpóreo com as dimensões prostáticas, especialmente com a dimensão CC ($r = 0,37$ $p = 0,032$), o que foi observado também por RUEL et al. (1998), LOWSETH et al. (1990) e ATALAN et al. (1999). Observou-se ainda correlação do peso da próstata (PP) com o peso corpóreo ($r = 0,44$; $p = 0,008$) e com as dimensões CC ($r = 0,81$; $p < 0,0001$) e VD ($r = 0,44$; $p = 0,007$). A correlação positiva entre o peso corpóreo e o peso da próstata foi relatada também por ATALAN et al. (1999) que no mesmo estudo estabeleceram uma equação para estimar o peso da próstata a partir de medidas ultra-sonográficas.

O exame histopatológico revelou que os animais do grupo A apresentavam próstatas sem lesões e que todos os animais dos grupos B, C e D apresentavam algum tipo de lesão prostática. A afecção mais freqüente foi a HPB. Na maior parte das amostras analisadas verificou-se a associação de dois tipos de afecções: HPB e prostatite não bacteriana (72% dos animais). Em um animal do grupo C foi observada metaplasia escamosa de alguns ácinos associada à prostatite crônica. Essas observações estão de acordo com as feitas por BARSANTI & FINCO (1992), KRAWIEC & HEFLIN (1994), MUZZI et al. (1999), DI SANTIS et al. (2001) e MOURA (2004). Entretanto, OLIVEIRA et al. (2007) em estudo histopatológico da próstata de quarenta cães, não observaram freqüência alta de associação de afecções prostáticas. Talvez porque esses autores tenham examinado apenas um fragmento prostático por animal. A histopatologia nos permitiu constatar que a próstata de animais a partir de 4 anos de idade, em média, apresenta alterações. O complexo hiperplasia/hipertrofia prostática é um fenômeno fisiológico que aparece nos cães de meia idade a idosos e que só se manifesta clinicamente quando o aumento glandular é mais acentuado e provoca compressão uretral ou retal. Podendo, ainda, predispor a glândula a outros tipos de afecções como já foi relatado por BARSANTI & FINCO (1992), DI SANTIS et al. (2001) e GADELHA (2003).

Considerou-se tecido hiperplásico aquele que apresentava projeções papilares em uma camada de células de tamanho maior e que com freqüência apresentava ácinos císticos. A HPB foi classificada em epitelial, estromal e complexa e os cistos apareceram nas diversas formas. A maioria dos animais apresentou hiperplasia prostática epitelial (80%), seguida do tipo complexa (20%). Não foi observado o tipo estromal nesse estudo, contrariando os resultados de LOWSETH et al. (1990) e MOURA (2004), que observaram diminuição na proporção entre os componentes epiteliais e estromais de acordo com a idade, com maior incidência de hiperplasia do tipo estromal a partir de 7 anos de idade, em média. Ainda, DI SANTIS et al. (2001) e MOURA (2004), encontraram predominância de hiperplasia prostática complexa.

Os microcistos foram visualizados em 56% das próstatas hiperplásicas. Em todos os animais em que foram visibilizados (23,8%) microcistos à ultra-sonografia, houve confirmação na histopatologia. Alguns animais apresentaram hiperplasia cística detectada no exame histopatológico, mas não visíveis à ultra-sonografia. Segundo HASEGAWA et al. (1996), o padrão ultra-sonográfico de próstatas hiperplásicas é muito variável, de modo que muitas vezes não se pode identificar a HPB baseado no padrão ecogênico do órgão. As glândulas com hiperplasia cística podem não ser detectadas até que os cistos sejam grandes o suficiente para serem visíveis, alterando a ecogenicidade do órgão.

Constatou-se um peso prostático maior quando a HPB era cística quando comparamos esses parâmetros em cada animal. O mesmo foi observado por MOURA (2004) que sugeriu que a prostatite concomitante à HPB também pode aumentar o peso da próstata, seja pelo aumento de constituintes celulares ou alterações decorrentes do processo inflamatório.

A prostatite crônica não bacteriana apareceu sempre associada à hiperplasia e foi classificada em aguda quando havia predominância de neutrófilos ou macrófagos (16%) e crônica se houvesse predominância de linfócitos ou plasmócitos (83,3%). Foi classificada ainda em focal (27,7%) e difusa (72,3%). A prostatite pode aparecer sem sintomas clínicos ou sinais de infecção do trato urinário inferior recorrente. Os cães avaliados não apresentavam sinais de dor ao toque retal. Segundo WEIDNER et al. (2002), esse tipo de prostatite é a forma mais frequentemente observada em homens, algumas vezes causando dor e outras vezes de forma insidiosa. A prostatite crônica não infecciosa parece ser comum em cães adultos.

A figura 3 mostra fotografias de tecido prostático de cães com as lesões verificadas no exame histopatológico.

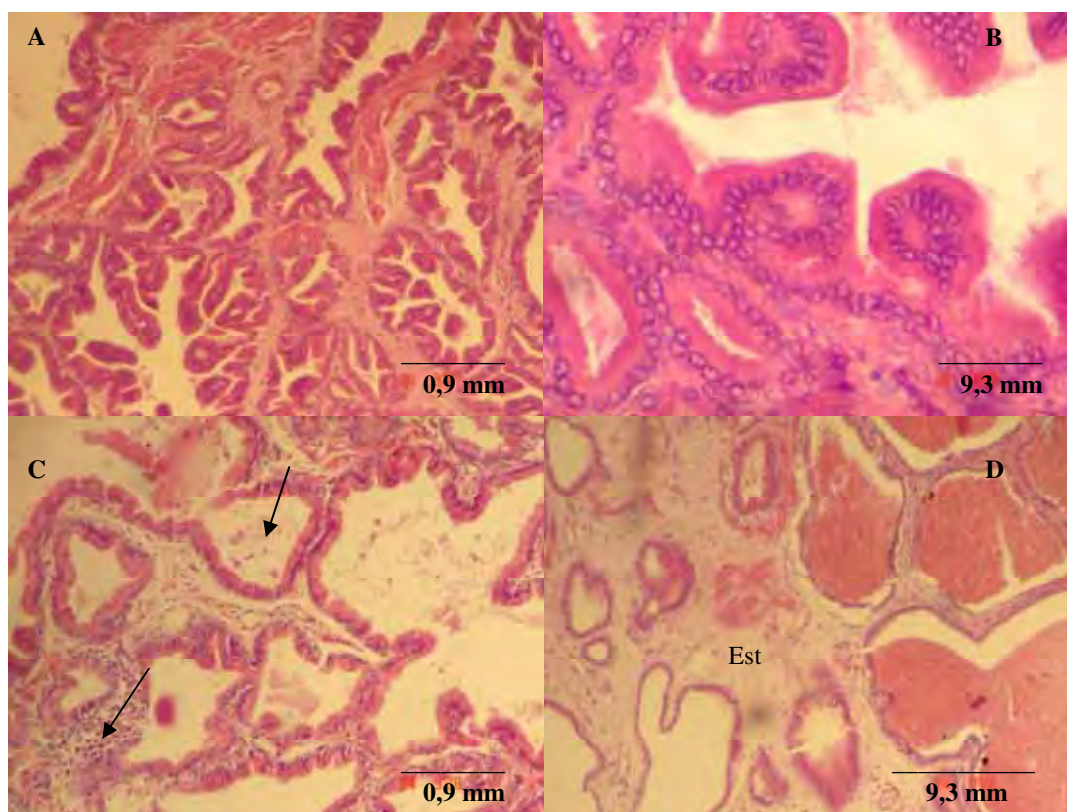


Figura 3. Fotomicrografias de tecido prostático canino obtido por necrópsia. **A** - tecido prostático sem alterações em cão do grupo A. **B** - hiperplasia prostática epitelial. Observar aumento no tamanho e número de células no epitélio dos ácinos. **C** – próstata com hiperplasia epitelial cística, associada a prostatite crônica não bacteriana. Observar a presença de cistos nos ácinos prostáticos, hipertrofia das células epiteliais e presença de células inflamatórias no estroma (setas). **D** - tecido prostático com hiperplasia cística complexa. Observar proliferação estromal (Est) e cistos com conteúdo hemorrágico.

4.2. Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A extração de RNA total a partir de amostras congeladas da próstata foi possível e eficiente. Observou-se grande quantidade de RNA total por espectrofotometria. A síntese de cDNA também foi eficiente com o “kit” utilizado.

A amplificação da CPSE foi realizada com sucesso em todas as amostras, utilizando o primeiro par de “primers” confeccionado (Fig. 4 e 5). Já a amplificação da PAP e do PSA foi mais complexa, sendo necessário testar três pares de “primers” e ajustar a reação, modificando temperatura de anelamento, quantidades de reagentes (cloreto de magnésio, taq polimerase), tipos de reagentes (Invitrogen e Qiagen) e até aumentando a quantidade de amostra para conseguir a amplificação. Para a PAP (Fig. 6 e 7) houve amplificação de todas as amostras, utilizando o “kit”, “primers” e temperatura descrita no item material e métodos, mas não foi detectada amplificação do PSA com nenhum par de “primer” utilizado.

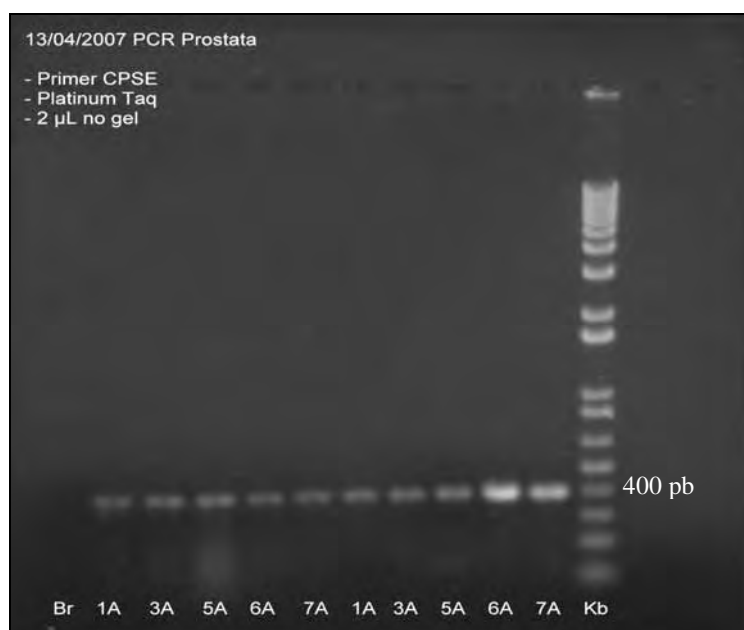


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da esterase específica da próstata canina (CPSE) para amostras do grupo A, utilizando a Platinum DNA Taq polimerase™ da Invitrogen. Observar tamanho da banda medida pelo marcador (Kb) em cerca de 400 pares de base (400pb).

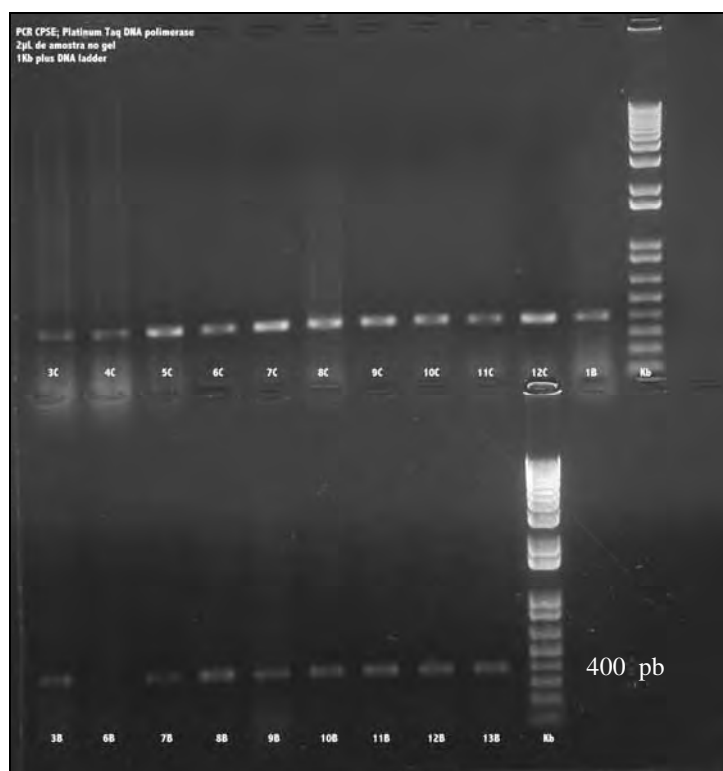


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos da PCR da esterase específica da próstata canina (CPSE) para amostras dos grupos B e C, utilizando Platinum Taq DNA polymerase™ da Invitrogen. Observar tamanho da banda medida pelo marcador (Kb) em cerca de 400 pares de base (400pb).



Figura 6. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da fosfatase ácida prostática (PAP) do grupo A, utilizando a Platinum DNA Taq polimerase™ (Invitrogen). Observar tamanho da banda medida pelo marcador (Kb) em cerca de 300 pares de base.

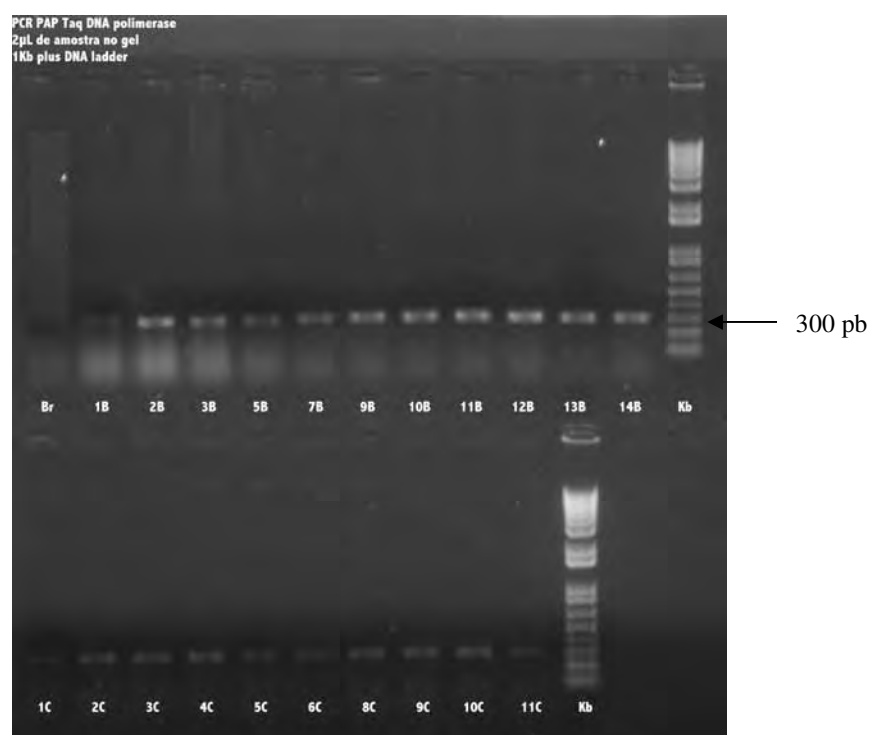


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de PCR da fosfatase ácida prostática (PAP) de amostras dos grupos B e C, utilizando a Platinum DNA Taq polimerase™ (Invitrogen). Observar tamanho da banda medida pelo marcador (Kb) em cerca de 300 pares de base.

A ausência de quantidades detectáveis de produtos de PCR para o PSA em cães corrobora os resultados de KARR et al. (1995) que não detectaram RNAm, por “Southern blot”, em cães. AGGARWAL et al. (2006) também não verificaram concentrações significativas de cDNA de PSA em tecido prostático de cães (beagle), ratos e macacos por meio de PCR em tempo real. Esses autores sugerem que o PSA não é expresso na próstata canina. Observamos nesse estudo que o cDNA para PSA não foi detectado em tecido prostático de cães saudáveis de qualquer idade, tampouco na próstata de cães com alterações da glândula.

Outros estudos, utilizando instrumentos diagnósticos diferentes, questionam a produção de PSA pelas células epiteliais da próstata do cão (CHAPDELAIN et al., 1988; BELL et al., 1995; GOBELLO et al. 2002), já que sua função seria clivar uma proteína produzida na vesícula seminal que coagula o sêmen e o cão não possui vesícula seminal, nem forma coágulos seminais. Embora existam similaridades entre a próstata humana e a próstata canina, não se pode inferir que os mesmos elementos bioquímicos ocorram ou exerçam as mesmas funções nas duas espécies. O PSA tem grande importância no diagnóstico e no monitoramento do tratamento de doenças prostáticas em humanos, mas não tem a mesma utilidade na avaliação da próstata canina.

A quantificação dos produtos da PCR da CPSE e da PAP foi realizada por um “software” e está descrita na tabela 4. Os produtos da reação de PCR da β -actina também foram quantificados para que pudesse ser utilizada como um calibrador da reação e dessa forma comparar o nível de expressão de cada enzima nos grupos, a fim de diminuir os efeitos da variação da amplificação de cDNA que pode ocorrer na PCR (Fig. 8).

Tabela 4. Quantidade aproximada dos produtos da PCR, em ng/mL, da esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e β -actina obtida por meio da mensuração das bandas realizada por software Image Aide 3.06.04 Analysis Software – Spectronics Corporation, nos grupos A, B, C e D, Jaboticabal, 2008.

Grupo	CPSE (ng/mL)	PAP (ng/mL)	β -actina (ng/mL)
A	13,2 $\pm$ 7,2 ^a	19,7 $\pm$ 13	14,5 $\pm$ 7,3
B	16,2 $\pm$ 4,4 ^a	12,80 $\pm$ 10,8	14,36 $\pm$ 5,8
C	20,6 $\pm$ 16,48 ^a	12,40 $\pm$ 6,48	20,6 $\pm$ 5,45
D	57,2 $\pm$ 16,0 ^b	6,6 $\pm$ 5,0	13,3 $\pm$ 2,5
CV%	29,2%	40%	21,65%

Letras diferentes nas colunas indicam diferença ($p \leq 0,05$)

Para que os valores de produtos de PCR para a PAP estivessem dentro da curva de normalidade foi necessário fazer a transformação angular dos dados pelo arcoseno de acordo com a fórmula:

Variável (enzima) $T = \arcsin(\sqrt{(\text{enzima})/100})$. (SAS)

Não houve variação significativa na quantidade “amplicons” de acordo com a idade dos animais (grupos A, B e C). Entretanto, a quantidade de “amplicons” de CPSE foi significativamente maior no grupo de animais que possuíam alterações na glândula (grupo D), podendo-se inferir que a expressão dessas enzimas não se altera com a idade do animal, mas pode estar aumentada em caso de doenças prostáticas. O mesmo não foi observado para a PAP, tampouco houve correlação para as quantidades de “amplicons” entre as duas enzimas, sugerindo que a regulação desses dois genes se dá por mecanismos diferentes. Observou-se também que a quantidade de transcritos para a PAP dentro de cada grupo variou muito. A reação foi repetida e em todos os ensaios obteve-se variação similar. Tal resultado também foi observado anteriormente por GADELHA (2003), quando avaliou as concentrações séricas de PAP em cães mestiços com mesma faixa etária dos animais desse estudo. Esse alto coeficiente de variação pode, em parte, ser devido à presença de lesões inflamatórias e proliferativas nos cães dos grupos

B, C e D que, segundo MCENTEE et al. (1987), podem interferir na expressão da PAP.

Nesse estudo foi possível observar que a expressão da CPSE em cães com tecido prostático afetado por hiperplasia prostática benigna é quase 70% maior que em cães saudáveis. LEROY et al. (2004) relataram que os níveis de RNAm para CPSE na próstata de cães saudáveis é alto, enquanto que no tecido prostático de cães com carcinoma primário é 10 a 15% menor. Embora não tenha sido encontrada nenhuma diferença significativa, observou-se um discreto aumento na quantidade de “amplicons” de CPSE de acordo com os grupos e diminuição dessa quantidade para a PAP.

Esses resultados corroboram os encontrados por SOUZA (1998) que observou concentrações séricas de PAP decrescentes de acordo com a idade, mas discordam dos obtidos por CORAZZA et al. (1994) que obtiveram concentrações maiores de PAP sérico à medida que a idade avançava. Esses autores observaram também níveis significativamente mais altos de PAP sérico quando os animais apresentavam afecções prostáticas. Nesse estudo, a expressão de PAP foi ainda mais baixa em cães com doença prostática, podendo-se inferir que a lesão do tecido prostático pode interferir na regulação do gene para a PAP, diminuindo sua expressão no tecido. Segundo HAKALAHTI et al. (1993), a expressão da PAP em próstata é alta na HPB e baixa no câncer prostático, sugerindo que o aumento dos níveis séricos dessa enzima no carcinoma de próstata é principalmente devido a um grau de destruição do epitélio e ductos acinares, que liberam a enzima para a circulação, do que ao aumento de sua expressão.

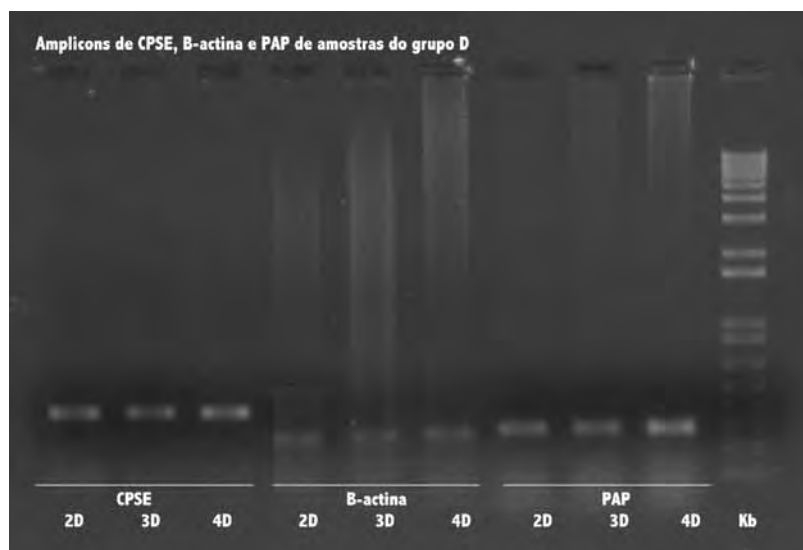


Figura 8. Comparação de intensidade das bandas em gel de agarose a 1% entre a esterase específica da próstata canina (CPSE), fosfatase ácida prostática (PAP) e a β -actina de amostras do grupo D.

Não foi encontrada nenhuma correlação entre a quantidade de “amplicons” e as dimensões prostáticas CC ($r = 0,29$ para CPSE; $r = 0,12$ para PAP) e VD ($r = 0,29$ para CPSE; $r = 0,1$ para PAP) obtidas por ultra-sonografia, quando os dados foram avaliados por grupo ou em conjunto. Dessa forma, pode-se sugerir que o aumento prostático não influencia a expressão de CPSE ou de PAP na próstata do cão. Embora, a hiperplasia prostática benigna possa estar associada a uma maior expressão de PSA e PAP em humanos (HAKALAHTI et al., 1993) e CPSE em cães (LEROY et al., 2004), parece haver outros mecanismos envolvidos na regulação dessa expressão além do aumento prostático.

A utilização do PSA e da PAP na avaliação da próstata humana suscitou o interesse no estudo dessas glicoproteínas na próstata canina, até para verificar se essa espécie poderia servir como modelo experimental para estudo de doenças prostáticas humanas. Apesar de a PAP ser uma proteína presente na próstata canina, sua regulação gênica parece ser diferente da que ocorre na próstata humana, especialmente diante de afecções da glândula. Sua utilização como

marcador tecidual de afecções prostáticas em cães fica comprometida pela alta variação de valores observados dentro de um mesmo grupo de animais.

O seqüenciamento dos fragmentos gerou, dentre outros formatos de dados, um arquivo gráfico (eletroferograma) contendo picos representativos dos quatro nucleotídeos ou bases possíveis (A para adenina, T para timina, C para citosina e G para guanina) e as posições relativas das bases, como números na parte superior, acima da discriminação de cada base representada por seu pico. Os erros de leitura do aparelho aparecem como uma letra N no lugar em que deveria aparecer uma base nitrogenada. A qualidade da seqüência é em parte analisada pela ausência de N no eletroferograma. As letras N que aparecem no final da leitura são referentes a ausência de bases, correspondendo ao término do sequenciamento. As figuras 9 e 10 ilustram os eletroferogramas de duas amostras analisadas para CPSE e PAP, respectivamente. Foi possível perceber que os produtos amplificados apresentaram tamanhos similares aos esperados a partir de cada par de “primer” utilizado.

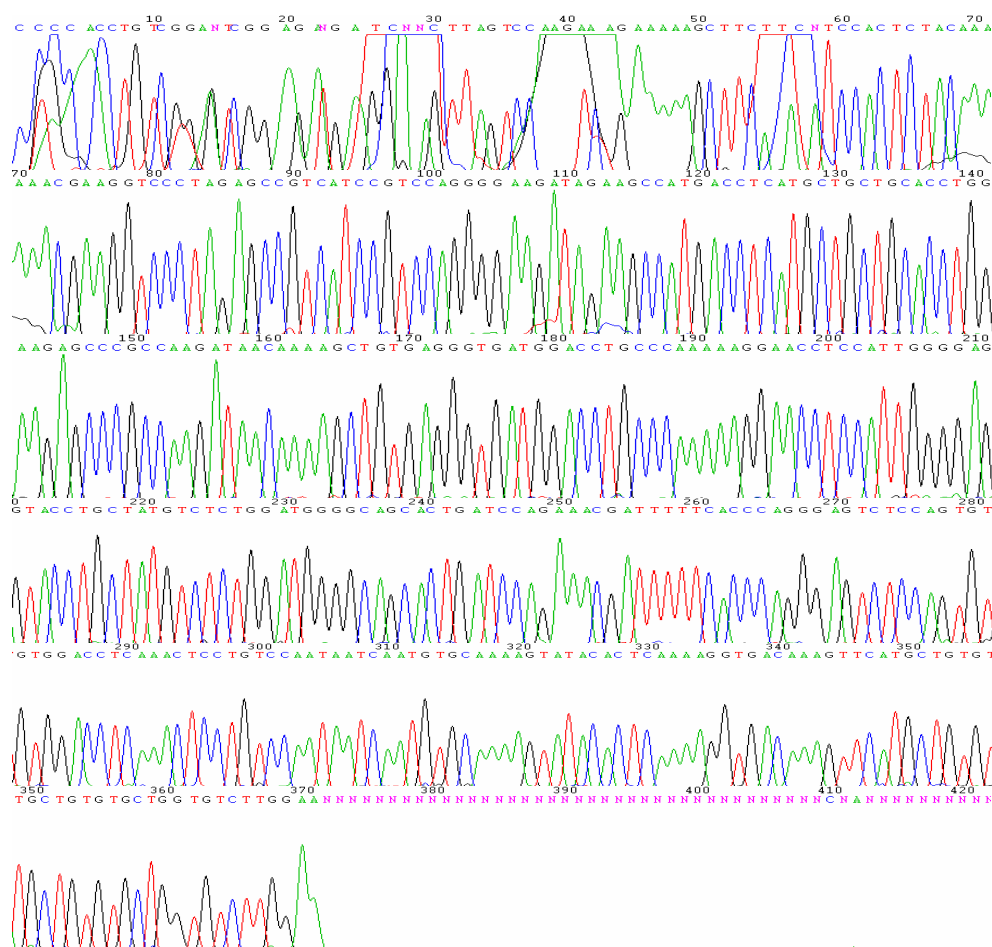


Figura 9. Eletroferograma de um produto de PCR para esterase específica da próstata canina (CPSE). Observar que a sequência obtida possui cerca de 400 bases, que corresponde ao tamanho esperado do produto amplificado e que não há erros na leitura da sequência (representados pela letra N no meio da leitura). Visualizado pelo aplicativo *Chromas®* (da Applied Biosystems) em uma interface gráfica para melhor visualização de picos e posições.

As seqüências submetidas ao BLASTn mostraram identidade alta para as seqüências utilizadas na confecção dos “primers”, tanto para a CPSE quanto para a PAP (96-100%), confirmando que os produtos da amplificação na RT-PCR eram referentes a CPSE e a PAP, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5. Comparação das seqüências obtidas no ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer, para as proteínas esterase específica da próstata canina (CPSE) e fosfatase ácida prostática (PAP), com as seqüências de nucleotídeos dessas proteínas disponíveis no Genbank, utilizando o BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov, acesso em 07/01/2008), Jaboticabal, 2008.

PAP		
Acesso (Genbank)	Descrição	Identidade (%)
XM54278.2	Predito: similar à fosfatase ácida de <i>Canis familiaris</i> , isoforma prostática, RNAm	96 – 100%
XM001495610.1	Predito: similar à fosfatase ácida de <i>Equus caballus</i> , próstata, (LOC100064835), RNAm	84 – 86%
XM001149021.1	Predito: fosfatase ácida prostática de <i>Pan troglodytes</i> , variante transcrita 2 (ACPP), RNAm	84 - 86%
NM0019099.3	Fosfatase ácida de <i>Homo sapiens</i> , próstata (ACPP), RNAm	81 – 86%
CPSE		
NM001003284.1	Gene da arginina esterase canina, cds completo	99 – 100%
M63669.1	Calicreína 2 relativa a peptidase de <i>Canis lupus familiaris</i> (KLK2), RNAm	95 – 97%
XM850491.1	Predito: Calicreína 1 de <i>Canis familiaris</i> , renal/pancreática/salivar, variante de transcrito 3 (KLK1), RNAm	79%
NM005551.3	Calicreína 2 relativa à peptidase de <i>Homo sapiens</i> (KLK2variante do transcrito 1, RNAm	76 – 79%
BT006650.1	Calicreína 2 de <i>Homo sapiens</i> , mRNA prostático, cds completo	76 – 77%

4.3. Imunoistoquímica

No que se refere à avaliação imunoistoquímica, o anticorpo anti-PSA marcou fracamente as células epiteliais dos grupos A e B (++) e não marcou as células do tecido prostático de cães dos grupos C e D (Fig. 11). Esses grupos de animais apresentavam lesões prostáticas, podendo-se inferir que tais lesões podem interferir na reação da enzima com o anticorpo. Tal resultado negativo pode ser devido ao anticorpo utilizado ser monoclonal, portanto muito específico para o PSA de tecido prostático humano, o que impossibilitou a reação cruzada com uma proteína similar na próstata canina alterada. VARMA et al. (2002) verificaram que a utilização de anticorpo monoclonal humano para avaliação da próstata canina também produziu resultado negativo. Por outro lado, MOURA (2004), utilizando anticorpo policlonal para o PSA, obteve marcação intensa para células de próstatas sem lesões, mas marcação fraca e menor quantidade de células marcadas em tecidos hiperplásicos. A imunorreação negativa e a marcação mais fraca e menos extensa na glândula hiperplásica pode ser justificada pelo fato do PSA ser uma glicoproteína representativa da atividade secretória do epitélio prostático, que tem sua função alterada quando há lesão deste tecido (McENTEE et al., 1987).

Para o anti-PAP houve marcação para o tecido prostático dos animais de todos os grupos (+++), sendo a intensidade da reação maior no grupo A. Os animais dos grupos B e C, apesar de terem apresentado boa marcação, mostraram intensidade variável, sendo esta menor próxima às regiões de ácinos císticos. Os animais do grupo D apresentaram intensidade de marcação menor quando comparada aos outros grupos (Fig.12). Esses resultados estão de acordo com a expressão gênica da PAP observada após a RT-PCR, que mostrou menor quantidade de “amplicons” no grupo D. A RT-PCR detecta a quantidade de RNAm presente em certa quantidade de células em determinado momento, enquanto a imunoistoquímica detecta a proteína já sintetizada e presente no citoplasma da

célula. Podendo haver diferença na regulação dos genes quando há afecção da próstata, diminuindo a sua expressão.

Para as duas proteínas, a marcação ocorreu no citoplasma das células epiteliais dos ácinos, principalmente na região apical, como observado em outros estudos (AUMÜLLER et al., 1987). A marcação das células prostáticas sem afecções foi verificada anteriormente (MCENTEE et al., 1987), inclusive com intensidade e uniformidade maior do que em tecidos hiperplásicos ou neoplásicos (NARITOKU & TAYLOR, 1982). A marcação das células de tecidos sem lesões foi uniforme como verificado por MOURA (2004), que observou ainda que a marcação do epitélio com hiperplasia apresentava intensidade variada. O mesmo foi relatado por MCENTEE et al. (1987) que observaram marcação imunoistoquímica negativa para a PAP e PSA na próstata de cães com cistos ou inflamação.

O método de imunoistoquímica é sensível, mas sua eficiência depende que a técnica esteja padronizada para o tipo de tecido em estudo e os anticorpos que serão utilizados. A técnica aqui utilizada possui diversas etapas capazes de provocar variações nos resultados, devido aos detalhes de temperatura, tempo, diluição e pH. Depois de ajustados os parâmetros, os resultados são obtidos rapidamente. Assim como a RT-PCR, a imunoistoquímica é uma técnica sensível e tem a vantagem de localizar as proteínas no tecido estudado, bem como de permitir a observação morfológica desse tecido.

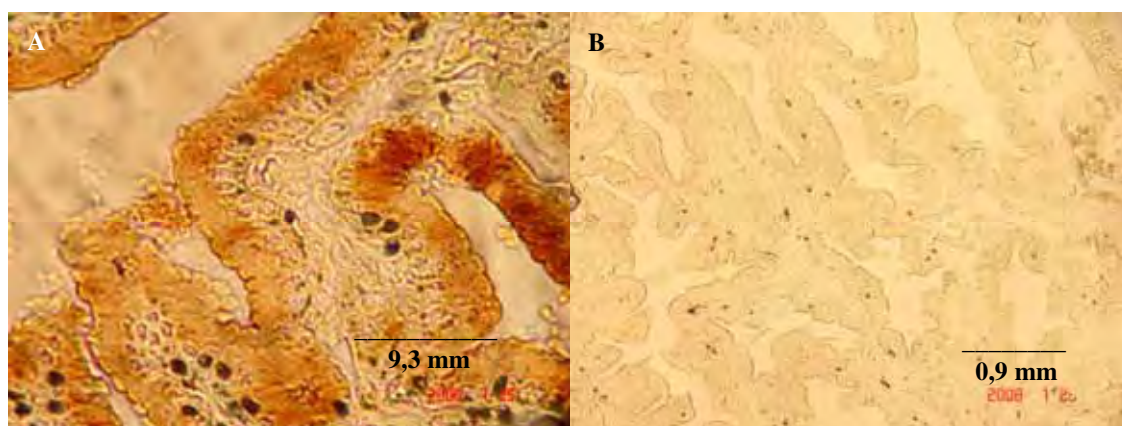


Figura 11. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica com anticorpo monoclonal anti-PSA (DAKO “mouse anti-human” N1550), pela técnica de streptoavidina-biotina-peroxidase, com recuperação antigênica, sem contra-coloração. **A** – tecido prostático marcado com anti-PSA de animais do grupo B. Observar marcação fraca do citoplasma de células do epitélio acinar, especialmente na região apical. **B** - tecido prostático canino apresentando marcação negativa com anti-PSA de animal do grupo D.

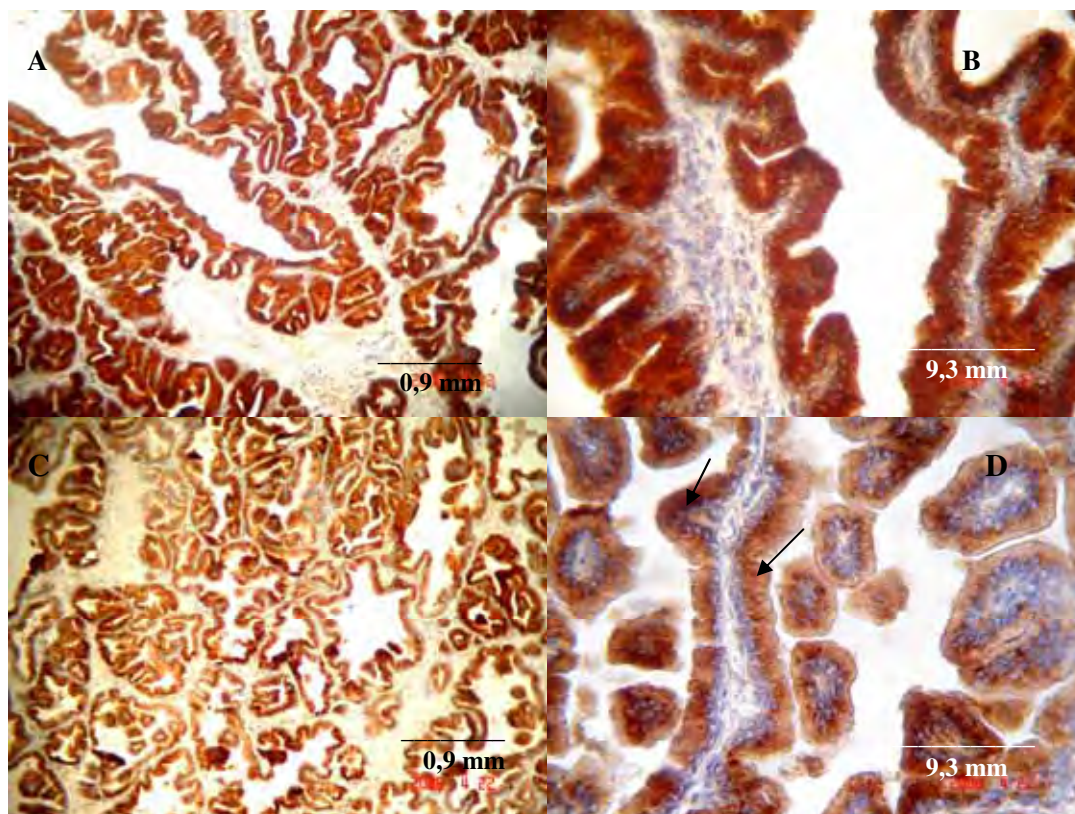


Figura 12. Fotomicrografia de reação imunoistoquímica com anticorpo policlonal anti-PAP (DAKO “rabbit anti-human” N1518), pela técnica de streptoavidina-biotina-peroxidase, com recuperação antigênica, contra-corado com Hematoxilina de Mayer. **A** e **B** – tecidos prostáticos caninos do grupo A. Observar a totalidade de células epiteliais marcadas (+++) e a intensidade da reação, bem como o acúmulo de cromógeno principalmente na região apical das células epiteliais. **C** e **D** - tecidos prostáticos caninos do grupo D. Observar intensidade de marcação menor (F) e desuniformidade de distribuição do cromógeno nas células (setas).

V. CONCLUSÕES

Nas condições em que esse estudo foi realizado e diante dos resultados obtidos, pode - se concluir que:

1. Dentre as proteínas estudadas a CPSE apresentou maiores possibilidades de utilização clínica para avaliação da próstata canina, devendo-se investigar melhor sua atividade diante de afecções prostáticas distintas.
2. A PCR, não detectou “amplicons” para o PSA a partir de tecido prostático canino.
3. A PAP não é um bom marcador para diagnóstico de afecções prostáticas, devido ao alto índice de variação nos valores na mensuração de sua expressão.
4. A regulação dos genes para as proteínas estudadas não é influenciada pela idade do animal nem pelas dimensões prostáticas

VI. REFERÊNCIAS *

ABLIN, R. J. A retrospective and prospective overview of prostate-specific antigen. **Journal of Cancer Research in Clinical Oncology**, v. 123, p. 583-594, 1997.

AGGARWALL, S.; RICKLIS, R.M.; WILLIAMS, S.A., DENMEADE, S.R. Comparative study of PSA expression in the prostate of mouse, dog, monkey and human. **Prostate**, v. 66, n. 9, p. 903-910, 2006.

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

ALIVIZATOS, G. et al. Efficacy of eight serially measured markers for diagnosis of prostatic carcinoma. **Archivos Españoles de Urologia.**, v.45, p.269-272, 1992.

AMORIM, R.L. et al. Serum and urinary measurements of prostatic acid phosphatase (PAP) and prostatic specific antigen (PSA) in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 320-324, 2004.

ARANTES, L. V.; FERREIRA, A. M. R. Avaliação histopatológica das principais afecções prostáticas dos cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 171-175, 2002.

ARMBRUSTER, D.A. Prostatic-specific antigen: biochemistry, analytical methods and clinical application. **Clinical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 181-195, 1993.

ATALAN, G. et al. Ultrasonographic estimation of prostatic size in canine cadavers. **Research in Veterinary Science**, v. 67, p. 7–15, 1999.

* ABNT 6023/2002

AUMÜLLER, G. et al. Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatase VII: imunohistochemistry of canine prostatic acid phosphatase. **The Prostate**, v. 11, p.1-15, 1987.

BARRA, M. B. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 50, n. 2, p. 173-184, 2006.

BARSANTI, J.A ; FINCO, D.R.. Moléstias prostáticas do cão. In ETTINGER, S._J., **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e gato**, 3 ed., São paulo: Manole, 1992, cap.105, p.1941-1963.

BARSANTI, J.A. Prostatic infectious: Diagnosis and therapy. **Bayer Selected Proceedings**, p.40-49, 1998.

BELL, F.W. et al. Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually and castrated dogs: 31 cases (1970-1987). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 199, n. 11, p. 1623-1630, 1991.

BELL, F.W. et al. Evaluation of serum and seminal plasma markers in the diagnosis of canine prostatic disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n.3, p. 149 -153, 1995.

BINDUKUMAR, B. et al. Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth. **Neoplasia**, v. 07, n. 3, p. 241-252, 2005.

BOSTIWICK, D.G. Prostate specific antigen: current role in diagnostic pathology of prostate cancer. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 102, n. 1, p. 31-37, 1995.

BURK, R.L.; ACKERMAN, N. **Small Animal Radiology and Ultrasonography – a diagnostic atlas and text**. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996, p. 240-241.

CARTEE, R. E.; ROWLES, T. Transabdominal sonographic evaluation of the canine prostate. **Veterinary Radiology**, v.24, n° 4, p. 156-164, 1983.

CHAPDELAINE, P. et al. Nucleotide sequence of the androgen-dependent arginine esterase mRNA of canine prostate. **Febs Letters**, v. 232, n.1, 187-192, 1988.

CHEW, D. J. An overview of prostatic disease. **Supplement Compendium of Educational. Practice Veterinary**, v. 19, n. 3, p. 80-85, 1997.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.

CHUANG, A. Y. et al. Immunohistochemical differentiation of high-grade prostate carcinoma from urothelial carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 1, p. 88-104, 2007.

CORAZZA, M. et al. Serum total prosthetic and non-prosthetic acid phosphates in healthy dogs and in dogs with prostatic disease. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, p. 307-310, 1994.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. O trato genital masculino. In: ROBBINS, **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 2000, p. 919-927.

DE ANGELIS, G. et al. Twenty Years of PSA: From Prostate Antigen to Tumor Marker. **Reviews in Urology**, v. 9, n. 3, p. 113-123, 2007.

DI SANTIS, G. W.; AMORIM, R. L.; BANDARRA, E. P. Aspectos clínicos e morfológicos das alterações prostáticas em cães – revisão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, f. 2, p. 46-52, 2001.

DUBÉ, J.Y. et al. Search for androgen response elements in the proximal promoter of the canine prostate arginine esterase gene. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 4, p. 304-311, 1995.

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

GADELHA, C.R.F. **Avaliação da próstata canina por palpação retal, ultrasonografia, citologia por punção aspirativa, cultivo bacteriano e dosagem de fosfatase ácida prostática no soro e plasma seminal**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GIMENO, E. J. Fundamentos de imunoistoquímica aplicada a patologia veterinária. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 7, 1995, Belo Horizonte. **Anais...**1995, p.35.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y. Serum and seminal markers in the diagnosis of disorders of the genital tract of the dog: a mini-review. **Theriogenology**, n. 57, p. 1285-1291, 2002.

HAKALAHTI, L. et al. Evaluation of PAP and PSA gene expression in prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma using northern-blot analyses, *in situ* and immunohistochemical stainings with monoclonal and bispecific antibodies. **International Journal of Cancer**, v. 55, p. 590-597, 1993.

HAMEED, O; HUMPHREY, P. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate. **Neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 241-252, 2005.

JOHNSTON, S. D. et al. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60, nº 61, p. 405-415, 2000.

JOHNSTON, S.D.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.M.S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001.

JUNIEWICZ, P. E. et al. Determination of canine prostatic size in situ: comparasion of direct caliper measurement with radiologic and transrectal ultrasonographic measurements. **Prostate**, v.14, p.55-64, 1989. ^A

JUNIEWICZ, P. E. et al. Transrectal ultrasonography as a method to monitor canine prostatic size in situ: measurements following endocrine manipulation and ejaculation. **Prostate**, v.14, p.265-277, 1989. ^B

KARR, J.F. et al. The presence of prostatic-specific antigen-related genes in primates and the expression of recombinant human prostate specific antigen in a transfected murine cell line. **Cancer Research**, v. 55, p. 2453-2462, 1995.

KAY, N.D. et al. Cytological diagnosis of canine prostatica disease using a urethral brush techniqe. **Journal of the Americam Animal Hospital Association**, v.25, p. 517-526, 1989.

KLAUSNER, J.S. et al. Recent developments in the diagnosis and treatment of HPB and prostatic carcinoma. **Proceedings of American College of Veterinary Internal Medicine**, p. 547-548, 1994.

KRAWIEC, D. R. Canine prostate disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.204, n.10, p.1561-1564, 1994.

KRAWIEC, D. R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 8, p.1119-1122, 1992.

LEAV, I.; LING, G. V. Adenocarcinoma of the canine prostate. **Cancer**, v. 22, p. 1329-1345, 1968.

LEROY, B.E. et al. Canine prostate carcinomas express markers of urothelial and prostatic differentiation. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 131-140, 2004.

LEWENHAUPT, A. et al. Tumor markers in human prostatic carcinoma. **Europe Urology**, v.17, p.7-11, 1990.

LILJA, H. Biology of prostate specific antigen. **Urology** (Supplement 5A), v. 62, p. 27-33, 2003.

LING, G.V. et al. Comparison of two sample collection methods for quantitative bacteriologic culture of canine prostatic fluid. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.196, nº 9, p.1479-1482, 1990.

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

McENTEE, M.; ISAACS, W.; SMITH, C. Adenocarcinoma of the canine prostate: immunohistochemical examination for secretory antigens. **Prostate**, v.11, p. 163-170, 1987.

MONTINORI, R. et al. Prostate specific antigen as a marker of prostate disease. **Virchows Archive**, v. 436, p. 297 – 304, 2000.

MOURA, V.M.B.D. **Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos**. 2004. 150f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

MOURA, V.M.B.D. et al. Mensuração de hormônios andrógenos, estrógeno, fosfatase ácida prostática (PAP) e antígeno prostático específico (PSA) e cães adultos com próstata normal e hiperplásica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n.1, p. 65 -73, 2006.

MUZZI, L. A.L. et al. Ultra-sonografia e citologia das afecções prostáticas em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 1999.

NARITOKU, W. Y.; TAYLOR, C.R. A Comparative Study of the Use of Monoclonal Antibodies Using Three Different Immunohistochemical Methods: An Evaluation of Monoclonal and Polyclonal Antibodies against Human Prostatic Acid Phosphatase. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 253 – 260, 1982.

OESTERLING, J.E. Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adenocarcinoma of the prostate. **Journal of Urology**, v. 145, p. 907 – 923, 1991.

OLIVEIRA, K.S. et al. Alterações prostáticas de cães adultos necropsiados na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás de maio a julho de 2004. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 2, p. 267-272, 2007.

OLSON, P.N. et al. Disorders of the canine prostate gland: pathogenesis, diagnosis and medical therapy. **Compendium Continuing Education Small Animal**. V. 9, nº 6, p. 613-623, 1987.

PAPSIDERO L.D. et al. Prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. **Cancer Research**, v. 40, p. 2428-2432, 1980.

PLOCH, N.R.; BRAWER, M.K. How to use prostate-specific antigen. **Supplement to Urology**, v. 43, n. 2, p. 27-35, 1994.

RUBIN, S. I. Localizing bacterial infection to the prostate gland. **Veterinary Medicine**, p. 369-377, 1990.

RUEL, Y.; BARTHEZ, P.Y.; MAILLES, A.; BEGON, D. Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.39, nº 3, p. 212-216, 1998.

SAIKI, R.K. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H.A. **PCR Technology**, 1 ed., New York: Oxford University Press, 1992. Cap. 1, p.7-16.

SERAKIDES, R. et al. Carcinoma de próstata com metástase óssea em cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.49, n. 3, p.385-388, 1997.

SHARIAT, S.F. et al. Comparison of Immunohistochemistry with Reverse Transcription-PCR for the Detection of Micrometastatic Prostate Cancer in Lymph Nodes. **Cancer Research**, v. 63, p. 4662–4670, 2003.

SHERIDAN, T. et al. The role of P501S and PSA in the diagnosis of metastatic adenocarcinoma of the prostate. **American Journal of Surgery and Pathology**, v. 31, n.9, p. 1351-1355, 2007.

SOUZA, F. F.; TONIOLLO, G. H. Marcadores de tecido prostático no cão. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v. 4, f. 3, p. 63-70, 2001.

SOUZA, F.F. **Estudo da próstata canina pelo exame ultrasonográfico, palpação retal, dosagens séricas de testosterona, 17 β -estradiol, fosfatase ácida prostática e antígeno específico prostático**. 1998. 85f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

SWINNEY, G.R. Prostatic neoplasia in five dogs. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 10, p. 669-674, 1998.

VARMA, M. et al. Polyclonal anti-PSA is more sensitive but less specific than monoclonal anti-PSA: Implications for diagnostic prostatic pathology. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, n. 2, p. 202-207, 2002.

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

WATERS, D.J. et al. Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. **Prostate**, v. 30, p. 92 – 97, 1997.

WEIDNER, W.; FALL, M.; JOHANSEN, T. E. B. Interstitial cystitis and prostatitis. **European Urology**, v. 42, n. 6 (Curriculum in Urology I-XI), 2002.

WEINBERG, R. A. Molecular mechanisms of carcinogenesis. **Scientific American**, v. 4, p. 01-12, 1996.

YIP, Y.L. et al. Quantitative analysis of the accuracy of linear array transrectal ultrasound in the measurement of the prostate. **British Journal of Urology**, v. 67, p. 79 -82, 1991.

YLIKOSKI, A. et al. Quantitative reverse transcription – PCR assay with an internal standard for the detection of prostate-specific antigen mRNA. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1397-1407, 1999.

ZELIVIANSKI, S. et al. Identification and characterization of regulatory elements of the human prostatic acid phosphatase promoter. **Oncogene**, v. 21, p. 3696-3705, 2002.

APÉNDICE

Apêndice 1.**LEI Nº 8966 DE 14 DE SETEMBRO DE 2005**

Dispõe sobre a prevenção e controle das zoonoses e endemias no Município de Fortaleza e dá outras providências.

FAÇO SABER QUE A CÂMARA MUNICIPAL DE FORTALEZA APROVOU E EU SANCIONO A SEGUINTE LEI:

CAPÍTULO I**DOS CONCEITOS E OBJETIVOS**

Art. 1º - As ações do Poder Público, objetivando o controle das populações animais, a prevenção e o controle das Zoonoses e endemias no Município de Fortaleza, serão reguladas por esta Lei. Art. 2º - Para efeito desta lei, entendese por. I - ZOONOSE: Infecção ou doença infecciosa transmissível naturalmente entre animais vertebrados e o homem e vice-versa; II - AUTORIDADE SANITÁRIA: Médico Veterinário ou outros a serem credenciados e treinados especificamente para a função de controle animal; III - ÓRGÃO SANITÁRIO RESPONSÁVEL: Setor de controle de zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde; IV - ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO/ DOMÉSTICOS: Os de valor afetivo, passíveis de conviver com o homem; V - ANIMAIS DE INTERESSE ECONÔMICO: As espécies domésticas, criadas, utilizadas ou destinadas à produção econômica; VI - ANIMAIS UNGULADOS: Os mamíferos com os dedos ou pés revestidos por cascos; VII – ANIMAIS SOLTOS: Todo e qualquer animal errante, encontrado sem nenhum processo de contenção; VIII - ANIMAIS APREENDIDOS: Todo e qualquer animal capturado por servidores credenciados pelo Município, compreendendo desde o instante da captura, transporte e alojamentos nas dependências de setor da Secretaria Municipal de Saúde; IX - ALOJAMENTOS MUNICIPAIS DE ANIMAIS: As dependências apropriadas de setor da Secretaria Municipal de Saúde, para alojamento e manutenção dos animais apreendidos; X - CÃES MORDEDORES VICIOSOS: Os causadores de mordeduras a pessoas ou a outros animais, em logradouros públicos; XI - MAUS-

TRATOS: Toda e qualquer ação voltada contra os animais, e que implique crueldade, especialmente na ausência de abrigo, cuidados veterinários, alimentação necessária, excesso de peso de carga, tortura, uso de animais feridos, submissão a experiências pseudocientíficas e o que mais dispõe o Decreto Federal nº 24.645, de 10 de julho de 1.934, a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, de 27 de janeiro de 1978, a Lei de Crimes Ambientais nº 9.605, 12 de fevereiro de 1998, e o art. 225 do Capítulo VI de Meio Ambiente da Constituição Federal; XII – CONDIÇÕES INADEQUADAS: A manutenção de animais em contato direto ou indireto com outros animais agressivos e/ou portadores de doenças infecciosas ou zoonoses, ou ainda, em alojamentos de dimensões inapropriadas à sua espécie ou porte, ou aqueles que permitam a proliferação de animais sinantrópicos; XIII - ANIMAIS SELVAGENS: Os pertencentes às espécies não domésticas; XIV - FAUNA EXÓTICA: Animais de espécies estrangeiras; XV - ANIMAIS SINANTRÓPICOS: As espécies que, indesejavelmente, convivem com o homem, tais como os roedores, as baratas, as moscas, os pernilongos, as pulgas e outros; XVI - COLEÇÕES LÍQUIDAS: Qualquer quantidade de água parada; XVII - ZONA RURAL: Compreende imóveis situados no perímetro rural ou no campo, definido no Plano Diretor do Município; XVIII - ZONA URBANA: Compreende imóveis situados no perímetro urbano, definido no Plano Diretor do Município; XIX - RESPONSÁVEL PELOS ALOJAMENTOS MUNICIPAIS: Médico Veterinário registrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Ceará (CRMV/CE), credenciado para a função de controle animal; XX - CÃES PERIGOSOS: Cães com classificação de guarda e comprovadamente agressivos. Art. 3º - Constituem objetivos básicos das ações de prevenção e controle de zoonoses e endemias: I - prevenir, reduzir e eliminar a morbidade e a mortalidade, bem como os sofrimentos dos animais, causados por doenças e maus-tratos; II – preservar a saúde da população humana, protegendo-a contra zoonoses, endemias e agressões de animais mediante o emprego de conhecimentos especializados e experiências sem saúde pública. Art. 4º - Constituem objetivos básicos das ações de controle das

populações animais e vetores: I - prevenir, reduzir e eliminar a mortalidade desnecessária e as causas de sofrimento dos animais; II - preservar a saúde e o bem-estar da população humana. Art. 5º - É proibida a permanência, manutenção e trânsito dos animais nos logradouros públicos ou locais de livre acesso ao público, salvo: I - em estabelecimento adequadamente instalado para criação, manutenção, venda, exposição, competição, tratamento e internação de animais; e os abatedouros, quando licenciados pelo órgão competente, na forma da lei; II - a permanência e o trânsito de animais em logradouros públicos, quando: a) se tratar de cães ou gatos vacinados, com registro atualizado e contendo coleira com plaqueta de identificação, conduzidos com guia pelo proprietário ou responsável, com idade e força física suficientes para controlar os movimentos do animal; b) se tratar de animais de tração, providos dos necessários equipamentos para contenção e conduzidos pelo proprietário ou responsável, com idade que possa assumir as responsabilidades legais, e com força física e habilidade para controlar os movimentos do animal; c) se tratar de cães-guias, de pessoas deficientes visuais; d) se tratar de animais utilizados pela Polícia Militar, Corpo de Bombeiros ou outra corporação de utilidade pública conduzidos e acompanhados pelo responsável por sua guarda. Art. 6º - É expressamente proibida a presença de cães, gatos ou outros animais em praias, a qualquer título, salvo nas situações apontadas nas alíneas “c” e “d” do art. 5º desta lei.

CAPÍTULO II

DAS APREENSÕES

Art. 7º - Será apreendido todo e qualquer animal: I - encontrado em desobediência ao estabelecido nos arts. 5º e 6º desta lei; II - suspeito de raiva, leishmaniose ou outras zoonoses; III - submetido a maus-tratos por seu proprietário ou preposto deste; IV - mantido em condições inadequadas de vida ou alojamento; V - cuja criação ou uso esteja em desacordo com a legislação vigente; VI - mordedor vicioso, condição esta constatada pela autoridade sanitária ou comprovada mediante 2 (dois) ou mais boletins de ocorrência policial. Art. 8º - Os animais

apreendidos poderão ter a seguinte destinação, a critério do órgão sanitário responsável: I - resgate; II - leilão em hasta pública; III - doação para entidades de ensino e pesquisa, desde que sejam obedecidas rigorosamente as legislações municipal, estadual e federal vigentes; IV - abate; V – adoção por particulares ou doação para entidades protetoras de animais devidamente cadastradas; VI - eutanásia. § 1º - O resgate dos animais apreendidos depende de requerimento e pagamento da multa e dos custos da apreensão e da guarda, bem como das demais despesas previstas, observados os seguintes prazos: a) dez (10) dias, para animais de espécie canina e felina, em Vigilância Epidemiológica de Raiva; b) três (3) dias, para animais de espécie canina e felina e livre da Vigilância Epidemiológica de Raiva. § 2º - Não se aplica o disposto nas alíneas “a” e “b” do § 1º deste artigo em casos de animais doentes ou com risco epidemiológico. § 3º - A liberação do animal não implica o direito de mantê-lo em liberdade. § 4º - O animal não reclamado e não retirado estará sujeito às demais hipóteses previstas no caput deste artigo. § 5º - Todo animal das espécies canina e felina poderá sofrer vacinação antirábica em sua liberação a critério do médico veterinário. Art. 9º - O Município de Fortaleza não responde por indenização nos casos de: I - dano ou óbito de animal apreendido; II – eventuais danos materiais ou pessoais causados pelo animal, durante o ato de sua apreensão. Art. 10 - Os atos danosos causados pelos animais são da inteira responsabilidade de seus proprietários, mesmo quando apreendidos pelo órgão responsável.

Parágrafo Único - Quando o dano ocorrer sob a guarda de preposto, estender-se-á a este a responsabilidade a que alude o caput deste artigo.

CAPÍTULO III

DA GUARDA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Art. 11 - É de responsabilidade dos proprietários a manutenção de cães e gatos em condições adequadas de alojamento, alimentação, saúde, higiene e bem-estar, bem como a destinação adequada dos dejetos. § 1º - Os animais devem ser alojados em locais onde fiquem impedidos de fugirem e agredirem terceiros ou

outros animais. § 2º - Os proprietários de animais deverão mantê-los afastados de portões, campainhas, medidores de luz e água, e caixas de correspondência, a fim de que funcionários das respectivas empresas prestadoras desses serviços possam ter acesso sem sofrerem ameaça ou agressão real por parte dos animais, protegendo ainda os transeuntes. § 3º - Em qualquer imóvel onde permanecer animal bravo, deverá ser afixada placa comunicando o fato, com tamanho compatível à leitura a distância, e em local visível ao público. § 4º - Constatado pela autoridade sanitária do órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses o descumprimento do disposto no caput deste artigo ou em seus parágrafos, esta poderá: I - intimar o proprietário para regularizar a situação em 30 (trinta) dias; II - persistindo a irregularidade, aplicar multa de R\$ 50,00 (cinquenta reais), que será majorada em 50% (cinquenta por cento), em caso de reincidência.

Art. 12 - É proibida a permanência de animais soltos, bem como toda e qualquer prática de adestramento em vias e logradouros públicos ou locais de livre acesso ao público. § 1º - O adestramento de cães deve ser realizado com a devida contenção em locais particulares e somente por adestradores devidamente cadastrados por um dos clubes cinófilos oficiais do município de Fortaleza. § 2º - Em caso de infração ao disposto no caput deste artigo e § 1º, o proprietário e o adestrador infratores sujeitam-se à pena de multa no valor de R\$ 100,00 (cem reais). § 3º - Se a prática de adestramento fizer parte de algum exibição cultural ou educativa, o evento deverá contar com prévia autorização do órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses. § 4º - Ao solicitar a autorização de que trata o § 3º deste artigo, o responsável pelo evento, pessoa física ou jurídica, deverá comprovar as condições de segurança para os frequentadores do local, condições de segurança e bem-estar para os animais, e apresentar documento com prévia anuência do órgão ou pessoa jurídica responsável pela área escolhida para a apresentação. § 5º - Em caso de infração ao disposto nos §§ 3º e 4º deste artigo, será aplicado multa de: I - R\$ 500,00 (quinhentos reais), para a pessoa física ou jurídica responsável pelo evento, caso não exista autorização para a sua realização; II - R\$ 300,00 (trezentos reais), para a pessoa física ou jurídica

responsável pelo evento, caso exista autorização, mas qualquer determinação do órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses esteja sendo descumprida.

CAPÍTULO IV

DAS OBRIGAÇÕES

Art. 13 - É proibido abandonar animais em qualquer área pública ou privada. Art. 14 - O proprietário é obrigado a permitir, sempre que necessário, o acesso da autoridade sanitária, quando no exercício de suas funções, às dependências do alojamento do animal para constatar maus-tratos ou sua manutenção inadequada, suspeita de doenças, bem como acatar as determinações dele emanadas. Art. 15 - O proprietário, o detentor da posse ou responsável por animais acometidos ou suspeitos de estarem acometidos de zoonoses, deverá submete-los à observação, isolamento e cuidados, na forma determinada pelo órgão competente. Art. 16 - Todo proprietário de animal é obrigado a vaciná-lo contra a raiva, observando para a revacinação o período recomendado pelo laboratório responsável pela vacina utilizada. Parágrafo Único - A vacinação de que trata o caput deste artigo poderá ser feita gratuitamente nas campanhas periódicas promovidas pelo órgão municipal responsável pelo controle da zoonoses, ou nesse órgão durante todo o ano. Art. 17 - O comprovante de vacinação fornecido pelo órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses, como também a carteira emitida por médico veterinário particular, poderão ser utilizados para comprovação da vacinação anual. Parágrafo Único - Da carteira de vacinação fornecida pelo médico veterinário deverão constar as informações, obedecendo à Resolução nº 656, de 13 de setembro de 1999, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Art. 18 - Em caso de morte do animal, cabe ao proprietário dar destinação adequada ao cadáver ou seu encaminhamento no serviço municipal competente. Art. 19 - Os animais das espécies canina e felina deverão ser registrados anualmente, sendo que: I - o registro de animais será regulamentado por Decreto do Poder Executivo do Município; II - todos os proprietários de cães e gatos são

obrigados a registrá-los na Prefeitura Municipal, pagando a correspondente taxa estabelecida através de decreto, sendo esse registro renovado a cada 12 (doze) meses; III - por ocasião do registro e renovação do mesmo, o proprietário deverá apresentar o atestado de vacina anti-rábica de seu animal, atualizado; IV - fica obrigado o Poder Executivo a destinar 50% (cinquenta por cento) da taxa de registro para desenvolvimento de programas de controle de natalidade, campanhas educativas, vacinação em massa e assistência a animais de rua e das camadas carentes da população; V – estarão isentos da taxa de registro os proprietários de animais: a) castrados, comprovado através de declaração do médico veterinário responsável; b) comprovadamente de baixa renda; c) que comprovarem ter adotado o animal posteriormente a instituição do sistema de registro, de entidade de proteção aos animais ou do próprio canil municipal. Art. 20 - Qualquer animal que esteja evidenciando sintomatologia clínica de raiva, constatada por médico veterinário, deverá ser prontamente isolado obedecendo ao protocolo do Ministério da Saúde. Art. 21 - É obrigado o uso de sistema de frenagem, acionado especialmente quando em descidas de ladeiras e descanso, nos veículos de tração animal.

CAPÍTULO V

DAS MEDIDAS PREVENTIVAS DE CONSERVAÇÃO DE IMÓVEIS

Art. 22 - Ao munícipe cabe a adoção de medidas necessárias para a manutenção de suas propriedades limpas e isentas de animais de fauna sinantrópica. Art. 23 - É proibido o acúmulo de lixo, materiais inservíveis ou outros que propiciem a instalação e a proliferação de roedores e outros animais sinantrópicos. Art. 24 - Os estabelecimentos que estoquem ou comercializem pneumáticos, ferro velho e sucata, são obrigados a mantê-los permanentemente isentos de coleções líquidas, originadas ou não pelas chuvas, de forma a impedir a proliferação de mosquitos e animais sinantrópicos. Art. 25 – As empresas recolhedoras de entulhos são responsáveis pelo depósito, nivelamento e compactação dos mesmos, a fim de impedir a criação e proliferação de roedores ou outros animais sinantrópicos. Art.

26 - Nas obras de construção civil é obrigatória a drenagem permanente de coleções líquidas, originadas ou não pelas chuvas, de forma a impedir a proliferação de mosquitos.

CAPÍTULO VI

DAS PROIBIÇÕES

Art. 27 - É proibida a criação e a manutenção de animais de espécie suína e ungulados, em zona urbana. Art. 28 - É proibida no Município de Fortaleza, salvo as exceções previstas nesta lei e as situações excepcionais, a juízo do órgão sanitário responsável, a criação, manutenção e alojamento de animais selvagens da fauna exótica. Parágrafo único. São adotadas as disposições pertinentes, contidas na Lei Federal nº 5.197, de 03 de janeiro de 1967, no que tange à fauna brasileira. Art. 29 - Somente será permitida a exibição artística ou circense de animais, após a concessão de licença e laudo específico emitido pelo órgão competente. Parágrafo Único. A licença e o laudo mencionado neste artigo serão concedidos com prévia vistoria técnica do órgão competente, em que serão examinadas as condições de alojamento e manutenção dos animais. Art. 30 - Não são permitidas, em residência particular, a criação ou alojamento de animais que, por sua espécie, número ou manutenção, causem risco à saúde e à segurança da comunidade. Art. 31 - É proibido o uso de animais feridos, enfraquecidos ou doentes, em veículos de tração animal.

CAPÍTULO VII

DAS PENALIDADES

Art. 32 - Verificada a infração a qualquer dispositivo desta lei, a autoridade sanitária, independente de outras sanções cabíveis decorrentes das legislações federal e estadual, poderá aplicar as seguintes penalidades: I - advertência; II - multa; III - apreensão do animal; IV - interdição total ou parcial, temporária ou permanente, de locais ou estabelecimentos. Art. 33 - As infrações de natureza sanitária serão apuradas em processo administrativo próprio e classificam-se em: I

- leves: aquelas em que o infrator seja beneficiado por circunstâncias atenuantes; II - graves: aquelas em que for verificada uma circunstância agravante; III - gravíssimas: aquelas em que for constatada a existência de 2 (duas) ou mais circunstâncias agravantes. § 1º - A pena de multa consiste no pagamento dos seguintes valores pecuniários: I - nas infrações leves: de R\$ 10,00 a R\$ 20,00; II - nas infrações graves: de R\$ 20,00 a R\$ 100,00; III - nas infrações gravíssimas: de R\$ 100,00 a R\$ 500,00. § 2º - Para efeito do disposto neste artigo, o Poder Executivo caracterizará as infrações de acordo com a sua gravidade. § 3º - Na reincidência, a multa será sempre aplicada em dobro. § 4º - A pena de multa não excluirá, conforme a natureza e a gravidade da infração, a aplicação de qualquer outra das penalidades previstas no art. 34 desta lei. § 5º - Independente do disposto no § 4º deste artigo, a reiteração de infrações de mesma natureza também autorizará, conforme o caso, a definitiva apreensão de animais, a interdição de locais ou estabelecimentos, ou a cassação de alvará de licença de funcionamento. Art. 34 - Compete à autoridade sanitária a aplicação das penalidades previstas nesta lei. Parágrafo Único. O desrespeito ou desacato à autoridade sanitária ou, ainda, a obstaculização ao exercício de suas funções, sujeitarão o infrator à penalidade de multa, sem prejuízo das demais sanções cabíveis. Art. 35 - Sem prejuízo das penalidades previstas nesta lei, o proprietário do animal apreendido ficará sujeito ao pagamento de despesas de transporte, alimentação, assistência veterinária e outras.

CAPÍTULO VIII

DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 36 - Ficam proibidos a criação, o alojamento e a manutenção de mais de 5 (cinco) animais, no total, das espécies canina e felina, com idade superior a 90 (noventa) dias, no perímetro urbano, salvo nas propriedades urbanas que comportem tal manutenção sem prejuízo da qualidade de vida da população, mediante autorização da autoridade sanitária, segundo as determinações da presente lei. § 1º - A criação, o alojamento e a manutenção de animais, em

quantidade superior ao estabelecido no caput deste artigo, caracterizarão canil de propriedade privada. § 2º - Os canis de propriedade privada somente poderão funcionar após a vistoria técnica efetuada pela autoridade competente, quando serão examinadas as condições de alojamento e manutenção de animais e expedido o laudo pelo órgão responsável. Art. 37 - Os estabelecimentos de comercialização de animais vivos, com fins não alimentícios, ficam sujeitos à obtenção de laudo emitido pelo órgão responsável, renovado anualmente. Art. 38 - Os serviços de educação do Município e Secretarias Executivas Regionais (SER) são obrigados a: I - promover, periodicamente, campanhas para esclarecimento aos proprietários de animais dos meios corretos de manutenção e posse responsável dos mesmos, dos mecanismos para controle de sua reprodução, bem como da divulgação detalhada dos dispositivos desta lei, principalmente durante o período de adaptação; II - promover nas escolas municipais campanhas voltadas para estimular nos alunos noções de amor e respeito aos animais, esclarecer sobre a prevenção das zoonoses e ao meio ambiente como um todo. Art. 39 - Caberá ao órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses a execução de Programa Permanente de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos, em parceria com universidades, estabelecimentos veterinários, organizações não governamentais de proteção animal e com a iniciativa privada. Art. 40 – O órgão municipal responsável pelo controle de zoonoses deverá promover programa de educação continuada de conscientização da população a respeito da propriedade responsável de animais domésticos, podendo, para tanto, contar com parcerias e entidades de proteção animal e outras organizações não governamentais e governamentais, universidades, empresas públicas ou privadas (nacionais ou internacionais) e entidades de classe ligadas aos médicos veterinários. Parágrafo Único - Este programa deverá atingir o maior número de meios de comunicação, além de contar com material educativo impresso. Art. 41 - A manutenção de animais em edifícios condominiais será regulamentada pelas respectivas convenções. Art. 42 - Esta lei entra em vigor na data de sua publicação oficial, revogadas as disposições em contrário, especialmente a Lei nº 6.294, de 01 de

julho de 1988. PAÇO DA PREFEITURA MUNICIPAL DE FORTALEZA, em 14 de setembro de 2005. **Luizianne de Oliveira Lins - PREFEITA MUNICIPAL DE FORTALEZA.**

Apêndice 2.

Protocolo de extração de RNA total com TRIzol®

1. Macerar o tecido em TRIzol (50-100mg de tecido/ 1mL de TRIzol)
2. Homogeneizar em Vortex
3. Incubar em temperatura ambiente por 5 minutos
4. Acrescentar 200 µL de clorofórmio
5. Homogeneizar no Vortex por 15 segundos
6. Incubar em temperatura ambiente por 5 min.
7. Centrifugar a 12.000 G*, a 4°C por 15 minutos
8. Remover a fase aquosa para eppendorf de 1,5 mL (contém RNA)
9. Adicionar 500µL de álcool isopropílico e homogeneizar em Vortex
10. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar a 9.000 G*, a 4°C, por 10 minutos
12. Descartar o sobrenadante (observar o sedimento)
13. Lavar com 1mL de etanol 75% (álcool absoluto diluído em água DEPC)
14. Homogeneizar em Vortex
15. Centrifugar a 9.000 G*, a 4°C, por 5 minutos
16. Desprezar o álcool
17. Secar o sedimento por 5 minutos em fluxo laminar
18. Ressuspender em água DEPC (50 µL).
19. Homogeneizar suavemente.

Apêndice 3

Preparação da amostra para quantificação em espectrofotômetro

- Diluir (1: 1000) a amostra em água Mili Q ou TE (1µL de solução de RNA em 999 µL de TE ou água Mili Q)
- Leitura no espectrofotômetro em absorbância de 260 nm e 280nm

- A relação entre RNA/DNA é medida pelos valores da absorbância a 260nm/valores da absorbância a 280nm (Abs 260/Abs 280)
- A relação ideal deve ser maior que 1,88
- O cálculo da quantidade de RNA total na solução é obtida pela fórmula

$$\text{RNAtotal} = (\text{Abs } 260) \times 40 \text{ (}\mu\text{g/ mL)} \times \text{fator de diluição.}$$

Apêndice 4

Protocolo de transcrição reversa utilizando o “kit” SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, 11904-018).

As reações devem ser realizadas para amostras contendo cerca de 5 µg de RNA total.

- Misturar nµg da amostra (padronizada para 5 µg) a 1µL de 10mM de dNTP mix, 1 µL de oligo (dT) (0,5 µg/µL) e nµL de água DEPC, com volume final de 10 µL
 - Incuba cada amostra a 65°C por 5 min em termociclador e ao final deixa em gelo por 1 min.
 - Fazer o “mix” contendo 2µL de tampão RT 10x, 4µL de 25mM de Cloreto de magnésio (MgCl₂), 2µL de 0,1 MDTT, 1µL de RNase out™ (inibidor de RNase) para cada 1µL da amostra.
 - Incubar a 42°C por 2 minutos
 - Adicionar 1µL de transcriptase reversa para cada amostra, misture e incube a 42°C por 50 min.
 - Terminar a reação a 70°C por 15 min. e colocar amostras no gelo.
 - Adicionar a cada amostra 1µL de RNase H e incubar por 20 minutos a 37°C.
- Todas as incubações a quente serão realizadas no termociclador.

Apêndice 5

Componentes da reação de PCR com Platinum Taq polimerase (Invitrogen)

Reagentes	Quantidade para uma reação (μL)
Água DEPC	6,5
Tampão 10x	1,0
MgCl ₂ (50mM)	0,3
DNTP (50μM/cada base)	0,2
Primer forward	0,4
Primer reverse	0,4
Taq polimerase (1UN)	0,2
cDNA	1
Σ	10

Apêndice 6

Protocolo de reação de seqüenciamento (volume de 10 μL)

Componentes da solução	Quantidade (μL) para 1 reação.
Big Dye Terminator	1
Tampão save \$\$ 5x	3
Primer forward ou reverse	0,2
Amplicons	De acordo com a quantificação em gel a 1%
Água DEPC	Completar para 6μL

Após adicionar os componentes, colocar os tubos com a solução no termociclador e iniciar a reação:

Desnaturação inicial : 96°C por 1 min

Desnaturação: 96°C por 15 seg

Anelamento: 50°C por 15 seg

Extensão: 60°C por 4 min

Final: 4°C

} 30 ciclos

Após a reação em termociclador para adição dos nucleotídeos fluorescentes, realizar a precipitação alcoólica de DNA Isopropanol/Etanol (Reação feita em placa)

1. Aplicar 80µL de álcool isopropílico a 80% em cada amostra.
2. Selar a placa com fita crepe e deixar a temperatura ambiente por 15 minutos (a placa pode permanecer dentro da centrífuga fechada – isso vai protegê-la da luz).
3. Centrifugar por 45 minutos (3000 G).
4. Descartar o sobrenadante, invertendo a placa sobre papel absorvente.
5. Aplicar um pulso na centrífuga com a placa invertida sobre o papel (cerca de 200 RPM com aceleração e desaceleração mínimas).
6. Aplicar 100µL de etanol 70% em cada amostra.
7. Centrifugar por 15 min nas mesmas condições descritas anteriormente (3).
8. Descartar o sobrenadante, invertendo a placa sobre papel absorvente.
9. Aplicar um pulso na centrífuga com a placa invertida sobre o papel (cerca de 200 RPM com aceleração e desaceleração mínimas).
10. Repetir passos de 7 a 10
 - Deixar o sedimento secando a temperatura ambiente e protegido da luz ou secar no termociclador por no máximo 30 segundos a 95°C.
 - Ressuspender as amostras com 10µL de formamida, misturar, desnaturar em 95°C por 2 minutos e colocar em gelo por um minuto.
 - Levar a placa ao seqüenciador.