

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

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE
NAS HEPATOPATIAS CRÔNICAS
CANINAS NÃO NEOPLÁSICAS**

LEANDRO BERTONI CAVALCANTI TEIXEIRA

**Botucatu - SP
Junho 2007**

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

**AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE
NAS HEPATOPATIAS CRÔNICAS
CANINAS NÃO NEOPLÁSICAS**

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

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim

**Botucatu-SP
Junho 2007**

Dedico este trabalho

A Deus que me guiou, me acompanhou, me
protegeu e me iluminou para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais José Eduardo e Maria Ileana, por terem me mostrado o valor de
uma vida honesta e sincera, sendo sempre meu espelho, porto seguro e razão
da minha força.

À minha Irmã Raffaella.
Deus me deu o privilégio de ter em minha irmã a minha melhor amiga.

Aos meus avôs, Júlio, Gianfranco e Bianca, cuja saudade me faz sempre
lembrar de onde eu vim e a minha avó Lena que ainda está conosco
representando todos eles.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Renée Laufer Amorim pela acolhida desde os tempos de residente e por me ensinar da maneira mais doce e alegre possível a ser um patologista.

Ao meu co-orientador Raimundo Alberto Tostes por toda a inspiração deste trabalho, pela amizade incondicional e por me abrir os olhos às possibilidades da vida.

A minha irmã pelos anos de convivência em Botucatu, que hoje são passado, mas que de modo algum serão esquecidos, pois foram a essência para que eu percebesse a sua importância na minha vida.

Ao Dr. Enio Pedone Bandarra, que junto com a minha orientadora, me deu a oportunidade de ingressar no mundo da patologia através da minha residência.

Aos professores do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Noeme Sousa Rocha e Julio Lopes Sequeira, pelos ensinamentos na patologia e na vida.

A minha namorada Tatiana, que fez do nosso pouco tempo de namoro uma vida inteira juntos.

Aos meus colegas de residência, Camila, Marcela e Arlete, que além de dividirem comigo o trabalho, também dividiram sonhos, angústias e alegrias.

Aos meus amigos Everton (Coio), Bruno (Cremilda), Tiago (Bóris), Gustavo, Bruno Menarim, Luciana Yamaguti, Pedro (Pânico) e José Roberto (Lango-lango) pelos momentos de alegria e companheirismo.

Aos meus amigos da patologia Marcela Rodrigues, Caio Burini, Giovana Di Santis, Pedro (Pânico), Rafael Torres Neto, Fábio de Andrade, Maury Raul, Maria do Carmo Vailati, Rômulo Lot obrigado pela amizade que se estende do ambiente de trabalho.

Ao amigo Paulo Felipe Izique Goiozo, pelos auxílios matemáticos deste projeto.

Aos Amigos do Unipinhal Carlos, Paulo, Ricardo, João Francisco, Fabrício, Wagner, Beto e Ronaldo; trabalhar ao lado de vocês torna as coisas muito mais fáceis e prazerosas.

Aos sempre presentes Cowboy e Schotch pela alegria incondicional de todos os dias.

E a todos aqueles que por simples falta de memória minha não constam desta lista, mas que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Anatomia e fisiologia hepática	03
2.2. Hepatite crônica canina	05
2.2.1. Contexto histórico das hepatites crônicas em cães	06
2.2.2. Aspectos epidemiológicos das hepatites crônicas caninas	08
2.2.3. Aspectos etiológicos	08
2.2.4. Progressão da doença	13
2.3. Proliferação e apoptose dos hepatócitos	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Seleção do material	24
3.2. Imunoistoquímica	25
4. RESULTADOS	
4.1. Dados epidemiológicos	29
4.2. Avaliação histológica	29
4.3. Análises imunistoquímicas	37
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática das unidades morfofuncionais do fígado: lóbulo e ácino hepático. (Fonte: adaptado de RUBIN & FARBER, 1998). 4
- FIGURA 2.** Esquemática da contagem de células positivas. Célula apresentando marcação nuclear fortemente positiva (seta), célula apresentando marcação nuclear fraca, não contada (cabeça de seta), célula negativa (seta vasada). Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contra-coloração Hematoxilina Obj 40X. 27
- FIGURA 3.** Percentual de casos de hepatite crônica distribuídos entre os graus de fibrose 30
- FIGURA 4.** Percentual de casos de hepatite crônica distribuídos entre os graus de infiltrado inflamatório. 30
- FIGURA 5.** FIGURA 5. Cão, Grau 1 de infiltrado inflamatório- Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal discreto. HE. (Barra 100µm). 32
- FIGURA 6.** Cão, Grau 2 de infiltrado inflamatório. Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal moderado, em meio a pontes de fibrose porto-portais. HE. (Barra 200µm) 32
- FIGURA 7.** Cão, Grau 3 de infiltrado inflamatório - Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal e parenquimal marcante, com destruição da placa limitante e desarranjo das traves e hepatócitos. HE. (Barra 100µm) 33
- FIGURA 8.** Cão, Grau 4 de infiltrado inflamatório – Infiltrado inflamatório mononuclear severo acompanhando a fibrose intensa do parênquima ao redor de um nódulo de regeneração formado. HE. (Barra 100µm) 33
- FIGURA 9.** Cão, Grau 1 de fibrose– Fibrose discreta confinada aos espaços porta evidenciada pela expansão fibrosa dos mesmos. Tricrômico de Masson. (Barra 100µm) 34
- FIGURA 10.** Cão, Grau 2 de fibrose – Fibrose moderada com expansão fibrosa dos espaço porta e início de formações de pontes porto-portais. Tricrômico de Masson. (Barra 200µm) 34
- FIGURA 11.** Cão, Grau 3 de fibrose – Perda parcial da arquitetura lobular com fibrose marcante, formação de septos porto-portais e porto-centrais e aparecimento de esboços de nódulos. (Barra 200µm) 35
- FIGURA 12.** Cão, Grau 4 de fibrose – Cirrose com intensa proliferação de tecido conjuntivo, proliferação de ductos biliares, congestão e formação de um nódulo regenerativo. Tricrômico de Masson. (Barra 100µm) 35
- FIGURA 13.** A. aspecto macroscópico da face visceral de um caso de cirrose hepática B. Face diafragmática do mesmo caso de A mostrando em detalhe nodulações do parênquima C. Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal se disseminando para região lobular. HE. D. Colestase intra-ductal marcante em um caso de cirrose, acompanhada de proliferação de ductos bliares. HE. E. Ducto biliar apresentando atipias reacionais: hiper celularidade, perda da polaridade celular e nucléolos evidentes. HE. F. Foco de células claras (seta) em um nódulo de regeneração de um caso de cirrose (Barra 20µm), 36
- FIGURA 14.** Fígado normal. Imunomarcção positiva em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contra-coloração hematoxilina. 37

FIGURA 15. Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina	38
FIGURA 16. Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção nuclear positiva e forte em hepatócitos neoplásicos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina	38
FIGURA 17. Hepatite Crônica. A. Imunomarcção nuclear positiva e em hepatócitos de um nódulo regenerativo de um caso de cirrose. B. Imunomarcção positiva das células ductais biliares demonstrando a proliferação de células ductais biliares em áreas de fibrose. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina.	39
FIGURA 18. Fígado normal. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina	39
FIGURA 19. Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina	40
FIGURA 20. Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina.	40
FIGURA 21. Fígado normal imunomarcção negativa Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina.	41
FIGURA 22. Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina.	42
FIGURA 23. Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina	42
FIGURA 24. Distribuição da marcação por PCNA dos casos de hepatite crônica	44
FIGURA 25. Distribuição da marcação por caspase-3 dos casos de hepatite crônica	44
FIGURA 26. Distribuição da marcação por p53 dos casos de hepatite crônica	45
FIGURA 27. Percentual de positividade para caspase-3, PCNA e p53 entre os diferentes grupos.	46

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1. Classificação etiológica de hepatites crônicas e cirrose em cães	11
QUADRO 2. Classificação morfológica de hepatites e cirrose em cães	12
TABELA 1. Anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, marca, diluições padronizadas, kit secundário e tempo de DAB.	25
TABELA 2. Distribuição das raças de cães em 38 casos de hepatite crônica	28
TABELA 3. Distribuição dos escores de atividade histológica por critério avaliado em números absolutos e percentuais.	29
TABELA 4. Graus de fibrose e inflamação e percentagem de células marcados pelos diferentes anticorpos nos diferentes casos de hepatites crônica.	40
TABELA 5. Percentagem de células marcados pelos diferentes anticorpos nos diferentes grupos.	42

TEIXEIRA, L.B.C. Avaliação da proliferação celular e apoptose na doença hepática crônica canina não neoplásica. Botucatu, 2007, 61p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As hepatites crônicas são comumente encontradas em muitas raças de cães na prática veterinária e independentemente da causa evoluem para um quadro de fibrose e conseqüentemente cirrose. Nos homens os quadros de hepatites crônicas e cirrose podem evoluir para lesões displásicas e conseqüentemente neoplásicas. Esta evolução do processo, como ocorre nos homens, não é bem definida nos cães. Alguns autores acreditam que possa ocorrer uma progressão das hepatites crônicas caninas para carcinomas hepatocelulares. Marcadores imunoistoquímicos são utilizados com o objetivo de avaliar o potencial pré-neoplásico das hepatites crônicas caninas. No presente trabalho, os marcadores imunoistoquímicos PCNA, caspase-3 e p53 foram utilizados com vistas a nos fornecer informações sobre a proliferação e apoptose dos hepatócitos e possíveis alterações genéticas que induzam a carcinogênese hepática. Os resultados obtidos mostram que as hepatites crônicas nos cães expressam estes marcadores em maior quantidade que o tecido hepático normal e de maneira mais próxima às lesões hepáticas neoplásicas o que permite afirmar que estas lesões têm potencial de sofrer alterações neoplásicas.

TEIXEIRA, L.B.C. Cell proliferation and apoptosis evaluation in chronic non-neoplastic canine disease Botucatu, 2007, 61p., Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Chronic hepatitis is usually found in several breeds of dogs in veterinary practice, and independently of the cause it progress to a stage of fibrosis and consequently cirrhosis. In men chronic hepatitis and cirrhosis may progress to dysplastic and neoplastic lesions. The evolution of this process, as occurs in men is not well established in dogs. Some authors believe that the progression of chronic canine hepatitis for hepatocellular carcinomas can occur. Some immunohistochemical markers can be used to assess the pre-malignant potential of the canine chronic hepatitis. In this study, the immunohistochemical markers PCNA, caspase-3 and p53 were used to give information about the proliferation and apoptosis index of the hepatocytes and the possible genetic alterations that can lead the hepatic carcinogenesis. Results show that the expression of these markers are higher in chronic canine hepatitis than in normal hepatic tissue and closer to the expression in the hepatocellular carcinomas, which allows us to confirm that these lesions have the potential of undergoing neoplastic alterations.

1. INTRODUÇÃO

As hepatites crônicas são comumente encontradas em muitas raças de cães na prática veterinária, sendo vista como uma doença com inevitável progressão para cirrose e conseqüentemente um prognóstico ruim (WATSON, 2004). Apesar de ser uma das alterações mais freqüentes na medicina interna canina, não é apenas uma doença, mas a manifestação clínica de diferentes etiologias nas quais o fígado se torna cronicamente lesionado (ROTHUIZEN, 2004).

Os avanços da gastroenterologia e hepatologia veterinária determinaram um incremento no diagnóstico de doenças hepáticas crônicas na população canina e progressivamente, a patologia veterinária vem ampliando o espectro etiológico de doenças hepáticas caninas. Esta ampliação vem acompanhada da necessidade de melhor entender a progressão desta doença uma vez que a influência destes agentes etiológicos na instalação e progressão das doenças hepáticas crônicas ainda é controversa (TOSTES & BANDARRA, 2004).

Independente da causa, as hepatites crônicas evoluem para um quadro de fibrose e conseqüentemente cirrose (SCHEUER, 2002; ROTHUIZEN, 2004). Nos homens os quadros de hepatites crônicas e cirrose podem evoluir para lesões displásicas e conseqüentemente neoplásicas (IDILMAN et al., 1998).

A carcinogênese hepática depende de vários passos, orientados por danos genéticos e alterações epigenéticas, que ocorrem por ação de diferentes agentes etiológicos como inflamação crônica, necrose de hepatócitos e infecções hepáticas virais contínuas (IDILMAN et al., 1998).

Esta evolução do processo, como ocorre nos homens, não é bem definida nos cães. A patogênese, principalmente das condições infecciosas, é intrigante, sendo que a progressão das hepatites crônicas para carcinomas hepatocelulares tem sido relatada por alguns autores (FUENTEALBA et al., 1997).

Neste contexto biomarcadores prognósticos para evolução da neoplasia se mostram úteis na identificação de fatores que possam induzir ou promover a carcinogênese. No presente trabalho, os marcadores imunistoquímicos “Antígeno nuclear de proliferação celular” (PCNA), caspase-3 e p53 foram utilizados com vistas a nos fornecer informações sobre a proliferação e apoptose dos hepatócitos e possíveis alterações genéticas que induzam a carcinogênese hepática.

Sendo assim este estudo tem por objetivos:

- Avaliar a expressão de PCNA, caspase-3 e p53 em amostras de fígados caninos com hepatopatias crônicas.
- Avaliar a expressão de PCNA, caspase-3 e p53 em amostra normal de fígado canino.
- Avaliar a expressão de PCNA, caspase-3 e p53 em amostra de carcinoma hepatocelulares canino.
- Avaliar se os graus de proliferação e apoptose hepática e a expressão de p53 nas hepatopatias crônicas não neoplásicas são indicativas de quadros pré-neoplásicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia e fisiologia hepática

O fígado é o maior órgão parenquimatoso do organismo dos animais e tem por funções principais sintetizar macromoléculas a partir de substâncias de pequeno peso molecular trazidas pelo sangue e metabolizar substâncias tóxicas trazidas pela artéria hepática e veia porta, realizando a sua excreção através do sistema biliar (ROTH, 1987).

Todas as funções químicas do fígado são realizadas pelos hepatócitos e são dependentes de relações complexas entre o sistema vascular (artéria hepática, ramos da veia porta, sinusóides e veias centro lobulares), os hepatócitos e o sistema de drenagem da bile (canalículos biliares e ductos biliares intra-hepáticos) (CRAWFORD, 2005).

Microscopicamente o fígado é composto de hepatócitos organizados em duas subunidades funcionais: o lóbulo e ácino hepático, sendo que o que os difere é a estrutura que é considerada o eixo central (ROTH, 1987).

O lóbulo hepático é uma estrutura hexagonal que se orienta ao redor de uma veia centro lobular e apresenta em suas extremidades espaços porta. Esta organização permite a divisão anatômica das camadas de hepatócitos em zonas, sendo a que está mais próxima da veia centro-lobular chamada de centro-lobular, a que está na periferia, mais próxima dos espaços porta, chamada de periportal e a zona intermediária chamada de mediozonal.(JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004) (Figura1).

A segunda subunidade funcional é o ácino hepático, que se distribui ao redor dos ramos terminais da veia porta e artéria hepática e é definido pelo parênquima que é irrigado por estes vasos, formando assim uma estrutura triangular. O ácino é dividido em 3 zonas, sendo zona 1, onde encontram-se os hepatócitos anexos ao espaço porta, zona 3, que refere-se aos hepatócitos ao redor da veia centro-lobular e zona 2, sendo a região intermediária a estas duas regiões. (ROTH, 1987; JUNQUEIRA & CARNEIRO 2004) (Figura1).

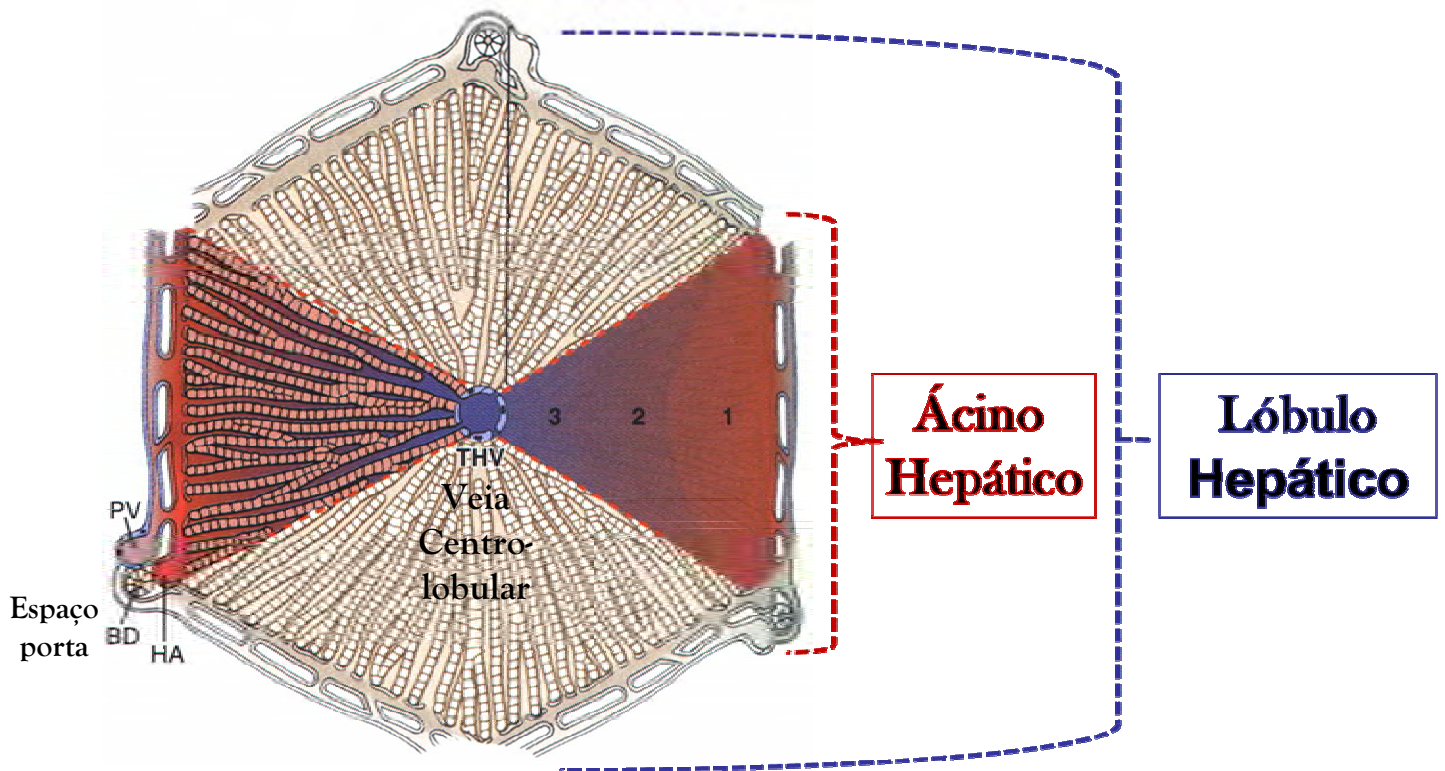


Figura 1. Representação esquemática das unidades morfofuncionais do fígado: lóbulo e ácino hepático. (Fonte: adaptado de RUBIN & FARBER, 1998).

O fígado possui uma reserva funcional e uma capacidade regenerativa consideráveis. Em animais saudáveis, mais de dois terços do parênquima hepático pode ser removido sem que haja prejuízos significativos da função hepática e a massa hepática pode se regenerar em questão de dias (CRAWFORD, 2005).

Em todas as espécies, distúrbios da função hepática tendem a produzir sinais semelhantes, independente da causa, mas tais sinais somente se manifestam quando a capacidade de reserva e regeneração do fígado são sobrepajadas. Sendo assim, somente lesões que afetam o fígado difusamente são capazes de produzir sinais de insuficiência hepática (CRAWFORD, 2005).

2.2 Hepatite crônica canina

A hepatite crônica pode ser definida como uma doença hepática de curso crônico e prolongado, com atividade necro-inflamatória e persistência de alterações laboratoriais por pelo menos quatro meses (THORNBURG, 1988).

As hepatites crônicas são comumente encontradas em muitas raças de cães na prática veterinária, sendo vista como uma doença, em seu curso natural, com inevitável progressão para cirrose e conseqüentemente um prognóstico ruim (WATSON, 2004).

Apesar de ser uma das afecções mais freqüentes na medicina interna canina, não é apenas uma doença, mas a manifestação clínica de diferentes etiologias por onde o fígado se torna cronicamente lesionado (ROTHUIZEN, 2004).

Independente da causa, as hepatites crônicas são caracterizadas pela perda da capacidade de regeneração do fígado em combinação com a formação de fibrose (ROTHUIZEN, 2004). A fibrose é uma resposta à agressão hepática, normalmente decorrente de lesões de curso prolongado e caracterizada pelo aumento da deposição de colágeno e outros componentes da matriz extra celular no fígado (TOSTES & BANDARRA, 2004). A associação de fenômenos de agressão hepatocelular, colapso e deposição de colágeno, destruição da arquitetura lobular e regeneração hepatocelular formam um conjunto de alterações que favorecem a fibrose difusa do parênquima hepático que, somada à presença de nódulos de regeneração, define cirrose hepática (TOSTES & BANDARRA, 2004). A cirrose constitui-se como um quadro terminal da doença hepática crônica que é acompanhada de marcante

distorção arquitetural com alterações circulatórias e metabólicas dramáticas para o fígado (STROMBECK et al., 1998).

2.2.1 Histórico das hepatites crônicas em cães

Os estudos das hepatites crônicas caninas têm como base as pesquisas das hepatites crônicas em pacientes humanos. Obviamente existe uma grande disparidade de recursos entre as pesquisas envolvendo cães e humanos, principalmente no que diz respeito ao acompanhamento dos casos de hepatite crônica por um longo prazo. Mas é importante valorizar os modelos experimentais, as classificações em humanos e tentativas de classificações veterinárias, que juntos servem de suporte para os estudos atuais de hepatologia canina (TOSTES, 2002).

No homem as hepatites crônicas passaram a ser mais estudadas a partir da segunda guerra mundial. Nas décadas de 50 e 60 as descobertas de etiologias virais e auto-imunes das hepatites trouxeram à tona nomenclaturas e conceitos relacionados à hepatite crônica, que começou a ganhar importância (BATTS E LUDWING, 1995; LUDWING, 1995).

Nas décadas seguintes, com a descoberta de novas formas virais de hepatite em humanos e a caracterização de um espectro etiológico mais amplo graças a novas técnicas diagnósticas, houve um aprimoramento da classificação das hepatites crônicas e a incorporação de novos critérios de análise histológica (ISHAK, 1994; BATTS E LUDWIG, 1995). Em medicina veterinária o termo hepatite crônica ativa apareceu pela primeira vez em 1976 (STROMBECK et al., 1976), e logo se sucederam as publicações de vários

trabalhos (BISHOP et al., 1979; DOIGE E LESTER, 1981; JOHNSON et al., 1982; THORNBURG, 1982; CRAWFORD et al., 1985; SARLI, 1992).

As classificações veterinárias seguiram o rumo das classificações das hepatites no homem, mas sem levar em consideração as inadequações de algumas nomenclaturas. Sendo assim, HARDY (1985), SEVELIUS et al. (1994), DILL-MACKY (1995) e FUENTEALBA (1997) compilaram alguns achados histológicos que fundamentavam as classificações humanas e classificaram as hepatites crônicas caninas.

Apesar destas classificações, é notória a dificuldade de se realizar uma unificação da nomenclatura veterinária para as hepatites crônicas caninas (TOSTES, 2002). Muitos processos crônicos que acometiam o cão eram pobremente entendidos até a realização de trabalhos experimentais no final da década de 80 (STROMBECK et al., 1988; TSUKAMOTO et al., 1990; BOOTH et al., 1992). Além disso, o fato de não se dispor de acompanhamento dos casos de hepatite crônica desde a primeira abordagem até a instituição do tratamento, impossibilita a definição de muitas formas de hepatite em cães (CENTER, 1995a; 1996a). No que se refere ao diagnóstico, a biópsia hepática é amplamente utilizada nas hepatopatias para a avaliação, classificação, estadiamento do paciente e delineamento dos seus fatores prognósticos, sendo considerada o diagnóstico definitivo (ROTH, 1987; JOHNSON e SHERDING, 1998).

As formas crônicas de hepatites em cães têm sido classificadas principalmente do ponto de vista morfológico (CENTER, 1995 e TOSTES, 2002). Apesar da existência de extensas descrições morfológicas de hepatites crônicas e de uma grande variedade de classificações propostas, a maioria dos

casos de hepatites crônicas ainda é referida como idiopática (CHOUINARD et al., 1998; BOISCLAIR et al. 2001, STERCZER et al., 2001 e VATNE, 2002). Uma questão que tem sido relevante é se as classificações de hepatite crônica prescindem ou não da referência à etiologia, pois nas hepatites humanas é fundamental a indicação ou sugestão da etiologia do processo com vista a considerar a melhor terapia. (TOSTES & BANDARRA, 2004).

2.2.2 Aspectos epidemiológicos das hepatites crônicas caninas

Do ponto de vista epidemiológico, as hepatites crônicas caninas ocorrem com maior freqüência em animais com idade entre um e sete anos (ANDERSSON & SEVELIUS, 1991). Algumas raças de cães são predispostas a desenvolverem hepatites crônicas, como os Cockers Spaniel americanos, West Highland White Terriers, Retriviers do Labrador e Doberman Pinschers (HARDY, 1985; CENTER 1996). Em cães da raça Bedlington Terriers e West Highland White Terriers o processo está relacionado a uma anomalia congênita no metabolismo cúprico (THORNBURG et al., 1996).

Não há claras evidências acerca de uma possível predisposição sexual, exceto no caso dos Doberman Pinschers, nos quais as hepatites crônicas prevalecem nas fêmeas (SPEETI et al., 1998).

2.2.3 Aspectos etiológicos

Nos humanos, a maioria dos casos de hepatites crônicas têm uma etiologia definida, sendo que apenas algumas permanecem idiopáticas (hepatites criptogênicas) (WATSON, 2004). A causa mais comum de hepatite

crônica nos humanos é a viral, principalmente as hepatites B e C. Em uma estimativa, 300 milhões de pessoas no mundo estão infectados com o vírus da hepatite B e 120 milhões com o vírus da hepatite C (WATSON, 2004).

Em contraste, em cães, a causa é geralmente desconhecida, e o diagnóstico então inespecífico. Ao contrário dos humanos o termo “hepatite crônica” definida histologicamente tornou-se um diagnóstico (WATSON, 2004).

As formas definidas de hepatite crônica em cães são: hepatite crônica ativa; hepatite crônica persistente; colangiohepatite crônica; hepatite crônica lobular e hepatite lobular dissecante (TOSTES, 1998). Destas, a mais comum em cães é a hepatite crônica ativa (ROTHUIZEN, 1997), que STROMBECK e GRINBBLE (1978) definiram clinicamente como uma doença onde um processo inflamatório crônico e agudo coexistem.

O entendimento das causas de hepatites crônicas, com exceção da doença de armazenamento de cobre nos Bedlington Terriers, mudou muito pouco nos últimos 30 anos, sendo na maioria dos casos consideradas “idiopáticas”, e de tratamento inespecífico e sintomático com prognóstico incerto (WATSON, 2004).

Dentre as principais causas de hepatites crônicas destacam-se o vírus da hepatite infecciosa canina, leptospirose e o uso crônico de corticosteróides e anticolvulsivantes (FUENTEALBA et al., 1997).

Doenças imunomediadas, condições inflamatórias do pâncreas e trato gastrointestinal, doença do armazenamento hepático de cobre nos Bedlington Terriers e West Highland White Terriers, e doenças associadas ao cobre dos Sky Terriers também estão associados às hepatites crônicas, culminando com o estágio final de fibrose hepática (FUENTEALBA et al.,

1997). Adicionalmente hepatites variando de aguda à crônica têm sido observadas na Escócia ocasionadas pelo vírus de células acidófilas (JARRET & O'NEIL, 1985, JARRET et al., 1987), um agente etiológico ainda não isolado e cuja real importância como causador de hepatite crônica permanece uma incógnita.

Já foram relatadas hepatites crônicas tóxicas causadas pela utilização de fármacos anticonvulsivantes como fenobarbital e primidona (DAYRELL-HART et al., 1991; DILL-MACKY, 1995; THOMAS et al., 1996;), antiparasitários como associação de dietilcarbamizina e oxibendazol (HARDY et al., 1989) e a exposição à aflatoxina (LITTLE et al., 1991).

A participação de processos metabólicos como o acúmulo de α -1 antitripsina como causador de hepatite crônica em cães e existência de hepatites auto-imunes nesta espécie têm sido discutidas (ANDERSSON e SEVELIUS, 1992; SEVELIUS et al., 1994).

Recentemente tem-se especulado a participação de novos agentes etiológicos infecciosos como o *Helicobacter ssp.* e protozoários do gênero *Leishmania infantum* no espectro de prováveis causadores de hepatites crônicas (FOX et al., 1996; RALLIS et al., 2005). O Quadro 1 lista a classificação etiológica atual das hepatites crônicas caninas e para fins de comparação o Quadro 2 apresenta a classificação morfológica de hepatites e cirrose em cães.

QUADRO 1. Classificação etiológica de hepatites crônicas e cirrose em cães

I Hepatopatia associada ao cobre
a) Primária: Bedlington terrier, West Highland White terrier, outras
b) Secundária
II Hepatite Infecciosa
a) Hepatite infecciosa canina
b) Leptospirose
c) Vírus de células acidófilas
III Hepatopatia induzida por toxinas e drogas
a) Anticonvulsivantes
b) Dietilcarbamazino-oxibendazol
c) Carprofeno (?)
d) Outras
IV Hepatopatia associada a distúrbios metabólicos
a) Deficiência de α -1 antitripsina
b) Defeito no metabolismo de glicoproteínas (?)
V Hepatites idiopáticas

Fonte: CENTER, 1996b; VATNE, 2002.

A progressão da enfermidade aguda para a cronicidade está condicionada à etiologia do processo (TOSTES & BANDARRA, 2004). Nas hepatites infecciosas provocadas por *Leptospira* ou Adenovírus Canino Tipo -1, a lesão hepatocelular pode evoluir insidiosamente por meses ou anos até manifestar alguma alteração clínica; quadro que encontra um evidente paralelismo nas hepatites virais do tipo B e C em pacientes humanos (TOSTES & BANDARRA, 2004).

A dificuldade de se estabelecer diagnósticos definitivos das hepatites crônicas caninas fica evidenciada em um recente trabalho realizado por Boomkens et al., (2005) que utilizaram a técnica de Reação de polimerase em cadeia (PCR) para identificar possíveis agentes infecciosos (Hepdnavírus, vírus da Hepatite A, C e E, Adenovírus canino, Parvovírus canino, *Helicobacter ssp*, *Leptospira ssp* e *Borrelia ssp*) em 98 amostras de fígado de cães com hepatite. Os autores não conseguiram detectar nenhum destes agentes pela

técnica de PCR nas amostras de fígado, concluindo que as hepatites nos cães não são causadas por agentes homólogos aos agentes causadores de hepatites em outras espécies.

Sem levar-se em consideração o Adenovírus Canino, sabe-se muito pouco sobre as outras causas infecciosas de hepatites crônicas e agudas. Porém sabe-se, pelo menos, que alguns poucos casos de hepatites caninas são causados pelo Adenovírus Canino (ROTHUIZEN, 2004), e a similaridade entre hepatites em cães e hepatites virais em humanos e outras espécies em que elas ocorrem (esquilos, ratos, garças, castores e patos) torna difícil acreditar que os cães são a única exceção à regra de que as hepatites são mais comumente uma doença viral (IDILMAN et al., 1998; ROTHUIZEN, 2004).

QUADRO 2. Classificação morfológica de hepatites e cirrose em cães

Hepatite aguda
Hepatite reativa inespecífica
Outras hepatites secundárias
Hepatite crônica inespecífica
Hepatite crônica
Hepatite crônica progressiva
Hepatite crônica ativa
Hepatite crônica persistente
Hepatite crônica lobular
Hepatite crônica agressiva
Hepatite lobular dissecante
Cirrose hepática (macro e micronodular)
Colangiohepatite crônica
Colangite
Cirrose biliar
Hepatite granulomatosa
Fibrose portal
Fibrose hepática idiopática

Fonte: VATNE, 2002

2.2.4 Progressão da doença

É difícil caracterizar a transformação de uma hepatite de fase aguda para crônica; clinicamente a transição é sutil e a avaliação histológica é fundamental para determinar o grau de severidade da doença (CENTER, 1996a; CENTER 1996b, SCHEUER, 2002; TOSTES et al., 2002b). Independente da causa, as hepatites crônicas evoluem para um quadro de fibrose e conseqüentemente cirrose (SCHEUER, 2002).

A fibrose é a resposta à agressão hepática, normalmente decorrente de lesões de curso prolongado e é caracterizada pelo aumento da deposição de colágeno e outros componentes da matriz extracelular no fígado (THORNBURG, 1983). A associação de fenômenos de agressão hepatocelular, colapso e deposição de colágeno, desestruturação da arquitetura lobular e regeneração hepatocelular formam um conjunto de alterações que favorecem a fibrose difusa do parênquima hepático, que somada à presença de nódulos de regeneração, definem a cirrose hepática (GAYOTTO & ALVES, 1995; TOSTES, 2002).

A cirrose é o quadro terminal da doença hepática, onde ocorre septação conjuntival cicatricial difusa do parênquima hepático com formação de nódulos de regeneração hepatocelulares, levando a marcante distorção arquitetural e alterações circulatórias e metabólicas dramáticas para o órgão (ANTHONY et al., 1978; JOHNSON, 1985; TWEDT, 1985; SARLI, 1992;; CRAWFORD, 1999).

Nos homens os quadros de hepatites crônicas e cirrose podem evoluir para lesões displásicas e conseqüentemente neoplásicas (IDILMAN et al., 1998). Esta evolução do processo, como ocorre nos homens, não é bem definida nos cães, a patogênese, principalmente das condições infecciosas, é intrigante, sendo que a progressão das hepatites crônicas para carcinomas hepatocelulares tem sido indicada por alguns autores (FUENTEALBA et al., 1997).

Uma relação entre uma doença viral e câncer é vista na interação entre o vírus da hepatite B e carcinomas hepatocelulares nos humanos (FUENTEALBA et al., 1997;) e na infecção pelo Hepadnavírus e carcinomas hepatocelulares em castores, esquilos terrestres, patos e garças (FUENTEALBA et al., 1997; IDILMAN et al., 1998).

Alguns estudos indicam que portadores do vírus da hepatite B dos humanos têm 200 a 300 vezes mais chance de desenvolver carcinomas hepatocelulares do que a população em geral (IDILMAN et al., 1998).

Em um estudo retrospectivo de 79 casos de hepatites crônicas em cães, SEVELIUS (1995), revelou que 2,5% dos cães com hepatites crônicas tiveram uma evolução do quadro hepático para neoplasias hepáticas.

Nos homens, os carcinomas hepatocelulares ocorrem em quase todos os casos com um antecedente de cirrose hepática (LOGUERCIO et al., 2003). Estudos apontam que a cirrose está presente em 90% dos pacientes humanos com carcinomas hepatocelulares, e estes raramente ocorrem na presença de hepatites crônicas sem cirrose (IDILMAN et al., 1998; LOGUERCIO et al., 2003).

O carcinoma hepatocelular é uma das neoplasias fatais mais comuns nos homens (TANNAPFEL et al., 1999). Os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento desta neoplasia em humanos estão associados ao sexo (masculino), uso de hormônios sexuais (andrógenos e progesteronas), consumo de álcool, exposição à aflatoxina B, desordens metabólicas do fígado e principalmente a presença de cirrose e infecção crônica pelos vírus da hepatite B e C (IDILMAN et al., 1998).

Nos cães as neoplasias hepáticas primárias perfazem 0,6 a 1,3% de todas as neoplasias caninas, e incluem os adenomas e carcinomas hepatocelulares e adenomas e carcinomas colangiocelulares (RAMOS-VARA et al., 2001).

Os carcinomas hepatocelulares são as neoplasias hepáticas primárias mais comuns em cães e perfazem cerca de 50% de todos os tumores. Os machos são mais afetados e mais de 80% dos tumores ocorrem em animais com mais de 10 anos (STROMBECK & GUILFORD, 1996; LIPTAK et al., 2004)

A etiologia dessa neoplasia está geralmente ligada a processos tóxico-ambientais tais como exposição à aflatoxina; mas a utilização ou exposição à drogas como tetracloreto de carbono, aminas aromáticas, pesticidas organoclorados, griseofulvina e outros também têm sido indicados como promotores de neoplasias hepáticas (STROMBECK & GUILFORD, 1996). Uma etiologia viral, assim como acontece com os homens no caso de hepatite B e C, tem sido demonstrada em castores, mas esses indícios ainda são fracos em cães (LIPTAK et al., 2004). Cirrose é rara em cães com carcinomas hepatocelulares (PATNAIK & LIEBERMAN, 1980). Em um estudo,

20% dos cães com carcinoma hepatocelular apresentavam outros tipos de tumor, principalmente tumores neuroendócrinos. Ainda não foi estabelecida nenhuma predisposição sexual ou racial para cães com carcinoma hepatocelular, apesar de os Schnauzers miniaturas e os machos serem representados em maior número em alguns estudos (PATNAIK, 1980).

A localização dos tumores é um fator prognóstico para carcinoma hepatocelular em cães, pois tumores localizados do lado direito e afetando os lobos lateral direito e lobo caudado apresentaram prognóstico pior, principalmente pela dificuldade de ressecção cirúrgica (LIPTAK, 2002). Outro fator prognóstico em cães é tipo morfológico, tendo os difusos e nodulares pior prognóstico que os massivos (LIPTAK, 2004).

A carcinogênese é um processo que depende de vários passos, orientados por danos genéticos e alterações epigenéticas, que ocorrem por ação de diferentes agentes etiológicos como inflamação crônica, necrose de hepatócitos e infecções hepáticas virais contínuas (IDILMAN et al., 1998).

Neste cenário a carcinogênese hepática tem sido estudada e alterações em genes específicos sugerem que podem ocorrer caminhos alternativos. Três mutações genéticas específicas permitem dividir os carcinomas hepatocelulares humanos em dois grupos, um apresentando mutação no gene β -catenina e outro apresentando mutações nos genes p53 e axina-1. As diferentes vias de carcinogênese destes dois grupos estão correlacionadas à etiologia, uma vez que os do segundo grupo estão correlacionados à presença do vírus da hepatite B e os do primeiro não (PITOT, 2001)

2.2.5 Proliferação e apoptose dos hepatócitos

A atividade regenerativa hepatocelular e apoptose dos hepatócitos são mecanismos importantes e necessários para a manutenção da homeostase do fígado (FARINATI et al., 2001; CANCHIS et al., 2004). O fígado é um órgão que apresenta renovação celular lenta, sendo a vida média dos hepatócitos estimada em 200 a 400 dias (MAGAMI et al., 2002). Em contraste exibe uma habilidade única de se regenerar em resposta à ressecção cirúrgica parcial, toxicidade química e infecções virais (CANCHIS et al., 2004). A maioria dos hepatócitos se desenvolve na vida pós-natal e a proliferação celular ocorre em todas as regiões do lóbulo hepático não se limitando a nenhuma zona específica (MAGAMI et al., 2002).

Para que ocorra a proliferação, as células têm que entrar em um processo complexo, o ciclo celular. Este controla o crescimento e proliferação das células, desenvolvimento dos organismos, regulação e reparo dos danos do DNA, hiperplasia dos tecidos em resposta à injúria e doenças como o câncer. Envolve inúmeras proteínas regulatórias que controlam a célula através de seqüências específicas de eventos, que culminam com mitose e produção de duas células filhas (SCHAFER, 1998).

Sendo assim os hepatócitos devem entrar em uma fase inicial, um processo reversível que é necessário para a progressão da fase quiescente G0 para a fase G1 do ciclo celular. Um balanço entre a sinalização através de citocinas e a expressão de genes reguladores pró-inflamatórios, transcricionais e anti-proliferativos durante a fase inicial estimula a progressão

dos hepatócitos para a fase G1, assim progredindo para a fase S, que é caracterizada subseqüentemente pela mitose e proliferação do hepatócito (CANCHIS et al., 2004). Portanto, os processos inflamatórios hepáticos podem exercer um papel crítico na promoção da proliferação hepática (CANCHIS et al., 2004).

Como na replicação, a apoptose celular é controlada por uma rede de mecanismos de sinalização positivos e negativos. As alterações na morte programada das células estão implicadas na patogênese de doenças auto-imunes, degenerativas, senis e infecções virais (FARINATI et al., 2001). A apoptose desempenha um papel significativo no curso da morte dos hepatócitos nas hepatites crônicas e agudas, pois está envolvida na remoção de hepatócitos lesionados ou infectados (POLAT et al., 2001).

Apoptose excessiva pode resultar em lesões celulares e disfunção tecidual ou atrofia, enquanto que a supressão da apoptose pode resultar em hiperplasia tecidual e promover a carcinogênese (PATEL, 2000).

A proliferação celular e a apoptose são processos altamente regulados que têm por função manter a homeostasia em organismos multicelulares. A perda da regulação destes processos esta envolvida diretamente com a carcinogênese hepática bem como em outros órgãos, e também está implicada no desenvolvimento de um amplo espectro de doenças como infecções virais, lesões imuno-mediadas, lesões tóxicas, desordens metabólicas e inflamatórias (PATEL, 2000; FARINATI et al., 2001; CANCHIS et al, 2004;).

A proliferação celular anormal é uma alteração biológica inicial no processo de carcinogênese, que pode ser particularmente importante na

ausência de um aumento concomitante da apoptose (FARINATI et al., 2001). A desregulação da apoptose pode permitir a sobrevivência de células que sofreram transformações malignas, e a falha dessas células transformadas em entrarem em apoptose pode contribuir para a expansão clonal (PATEL, 2000).

Em um estudo recente, a proliferação dos hepatócitos mostrou-se ser um fator de prognóstico confiável para o desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares em humanos com cirrose associada ao vírus da hepatite C (CANCHIS et al, 2004).

Neste contexto, a utilização de técnicas de imunistoquímica com anticorpos monoclonais tem sido de grande valia para o reconhecimento de epítomos de antígenos expressos por células em proliferação (MADEWELL, 2001).

O PCNA (antígeno de proliferação celular nuclear) é uma proteína não histônica de 36-kd auxiliar da DNA polimerase que se expressa em abundância em células em proliferação. Ele está presente somente na fase G1, S e G2 do ciclo celular (SARLI et al., 1995; SAFTOUI et al., 2003). A sua expressão começa no final da fase G1, atinge o seu pico máximo na fase S e permanece alta na fase G2 e M devido à sua longa meia vida (PEÑA et al., 1998). Ele faz parte de uma família de proteínas chamada de “família de deslizamento da fita de DNA”, que tem como função proporcionar a ligação das polimerases replicantes à fita de DNA, o que é necessário para a duplicação do genoma (MAGA & HÜBSCHER, 2003).

O PCNA também está relacionado com várias proteínas envolvidas em diversos processos relacionados com o DNA, tendo participação na replicação do DNA, no seu reparo, no controle do ciclo celular, no

metabolismo da cromatina, na expressão gênica e na apoptose (MAGA & HÜBSCHER, 2003).

Imunomarcção de PCNA pelo clone PC10 tem sido relatada em vários tecidos animais e humanos, inclusive fígados, fixados em formalina e processados em parafina (SARLI et al., 1995; ASSY, et al., 1998; PEÑA et al., 1998; SAFTOUI et al., 2003; SHEN et al., 2003; KOUKOULIS et al., 2005;)

A marcação imunoistoquímica das células por PCNA é uma técnica muito útil no estudo da atividade proliferativa de tecidos e tumores e se correlaciona com o prognóstico de vários tumores malignos (SARLI et al., 1995; SHEN et al., 2003).

Nas infecções pelo vírus da Hepatite B e C nos homens, a expressão de PCNA tem sido utilizada como um marcador prognóstico de desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares associados à processos inflamatórios, e com a presença de lesões nodulares hiperplásicas e displásicas em pacientes cirróticos (KRONENBERGER et al., 2000).

No cão a expressão de PCNA tem sido demonstrada de grande valia como fator prognóstico em tumores mamários, correlacionando-se com metástase e sobrevida (PEÑA et al., 1998).

A expressão de PCNA também se correlaciona com outros métodos de análise de proliferação celular como a expressão de Ki-67, técnica de Agnor, porcentagem de células em fase S e índice mitótico. (SARLI et al., 1995; PEÑA et al., 1998; SAFTOUI et al., 2003).

SAFTOUI et al. (2003) demonstraram através da análise da expressão de PCNA, que existe uma evolução progressiva dos índices proliferativos de nódulos regenerativos para nódulos displásicos e carcinoma

hepatocelular nas hepatites crônicas dos homens, e que na cirrose hepática a proliferação celular é o fator preditor individual mais forte de carcinoma hepatocelular.

Neste mesmo contexto, as caspases são mediadores cruciais no processo de apoptose, e entre elas, a caspase-3 se destaca como a caspase executora final, essencial para as alterações nucleares associadas à apoptose (PORTER & JÄNICKE, 1999).

Apoptose no fígado tornou-se o foco de muitas pesquisas desde que ficou aparente que a perda do seu controle está patofisiologicamente envolvida nas doenças hepáticas (SCHUMANN & GALLE, 2001).

Uma variedade de técnicas podem ser utilizadas para a detecção de células em apoptose no tecido hepático, entre elas a simples contagem de corpos apoptóticos pela coloração de Hematoxilina e Eosina, demonstração da clivagem de DNA pela técnica de TUNEL e a utilização de técnicas imunistoquímicas utilizando anticorpos principalmente contra Bcl-2 e caspase-3 (PATEL, 2000).

Estudos recentes indicam que a ativação das caspases é o indicador mais específico do mecanismo de morte celular programada e que, mais ainda, a identificação da caspase-3 como agente efetor final torna a sua detecção um indicador único e extremamente sensível de apoptose (GOWN & WILLINGHAM, 2002).

O gene supressor de tumor p53 tem como ação característica a indução tanto da parada do crescimento celular como da apoptose. Os níveis de p53 rapidamente aumentam após danos no DNA (ZÖRNIG et al., 2001), pois este gene tem a capacidade de reconhecer e se ligar a vários tipos de

danos e assim promover a parada do ciclo celular, e em casos de danos mais severos ao material genético, induzir a apoptose da celular (SCHAFER, 1998; ZÖRNIG et al., 2001). Após o dano no DNA, células com p53 mutante não param o ciclo celular, assim, a habilidade da célula de reparar os erros cromossômicos antes da mitose é perdida, e quando ocorre a mitose este erro se fixa no genoma (SCHAFER, 1998).

É amplamente aceito que alterações que afetam o gene p53 estão entre as alterações mais comuns que ocorrerem durante a progressão maligna em diversos tipos de neoplasias (AKYOL et al., 1999). Mutações no p53 têm sido identificadas em 50-55% de todas as neoplasias malignas nos homens (MÜLLAUER, 2001) Estas mutações ocorrem em regiões do p53 essenciais para a ligação com o DNA (MÜLLAUER, 2001) e resultam em mudanças na conformação da molécula do p53 que se torna mais estável e passível de ser identificada pelas técnicas de imunistoquímica (SCHAFER, 1998; AKYOL et al., 1999).

Em geral as mutações do p53 são mais freqüentes em neoplasias mais agressivas e têm relação com piores prognósticos (MÜLLAUER, 2001).

A expressão de p53 tem sido estudada em hepatites crônicas e carcinomas hepatocelulares em humanos, e mostrou uma correlação significativa com a proliferação celular e com a progressão das hepatites crônicas para o carcinoma hepatocelular (AKYOL et al., 1999; LOGUERCIO, et al., 2003). Vários trabalhos também têm estudado a significância do gene supressor de tumor p53 na carcinogênese nos homens e cães (LEE et al., 2004). Nos cães a expressão de p53 mostrou-se um bom indicador prognóstico nos casos de neoplasias ósseas (LOUKOPOULOS et al., 2003), mas em

contraste, nos mastocitomas esta correlação não foi estabelecida (GINN et al., 2000; JAFFE et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção do material

O presente trabalho foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu.

O material foi selecionado de outras pesquisas com fígado canino realizadas no Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Botucatu, sendo triados um total de 38 casos com diagnóstico de hepatite crônica.

Os fígados eram colhidos de cães que vieram a óbito com ou sem história de afecção hepática, sendo a necropsia realizada no máximo 24 horas após a morte do animal e o material coletado de regiões do órgão representativas das lesões.

Os diagnósticos de hepatite crônica basearam-se em critérios morfológicos com maior relevância ao infiltrado inflamatório mononuclear e graus de fibrose. Foram utilizados também um caso de carcinoma hepatocelular e um fígado normal que serviram de referência para a comparação das médias de positividade dos marcadores imunohistoquímicos dos achados de hepatites crônicas.

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

A avaliação das lâminas, em microscópio óptico foi realizada inicialmente em menor aumento (32X), seguindo-se para os aumentos subsequentes (100x, 250x e 400x). O aumento de 32x auxiliou a visualização global do material, permitindo avaliar o grau de fibrose do material e a localização do infiltrado inflamatório, e os aumentos de 100x, 250x e 400x foram utilizados para verificação do tipo celular predominante no infiltrado inflamatório e das alterações hepatocelulares.

Todos os casos que se enquadravam no diagnóstico de hepatite crônica, independentemente da etiologia, foram incluídos no experimento e classificados quanto ao grau de fibrose tendo como base a utilização de um escore semi-quantitativo segundo TOTES (2002).

Os casos foram subdivididos quanto à fibrose em 4 grupos de acordo com a proliferação de tecido conjuntivo: grupo 1 (expansão fibrosa dos espaços porta); grupo 2 (expansão fibrosa portal com septos); grupo 3 (preservação apenas parcial da arquitetura lobular com septos porta-porta e porta-centro e esboços de nódulos) e grupo 4 (cirrose ou predomínio de áreas nodulares em relação à lóbulos remanescentes) e quanto ao grau de infiltrado inflamatório em outros 4 grupos: grupo 1 (infiltrado discreto); grupo 2 (infiltrado moderado); grupo 3 (infiltrado marcante) e grupo 4 (infiltrado severo).

3.2 Imunoistoquímica

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

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

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

Em seguida foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, etapa esta que tem como objetivo a liberação dos epítomos antigênicos do tecido bloqueados pela solução fixadora (formol 10%).

Procedeu-se então a recuperação antigênica para todos os anticorpos com a solução de citrato 10mM, pH 6,0, solução esta, pré-aquecida

em banho-Maria a 96°C. Após o pré-aquecimento as lâminas foram introduzidas na solução e mantidas por 25 minutos.

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

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 10 volumes, realizando-se dois banhos de 10 minutos cada e em seguida, lavou-se o material em água destilada e posteriormente em solução tampão de TRIS HCl pH 7,4 (Trizma base, Sigma, T1503; NaOH P.A Merck, 106404.1000) por 10 minutos em duas trocas de cinco minutos cada.

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

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

TABELA 1: Anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, marca, diluições padronizadas, kit secundário e tempo de DAB.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Tipo de marcação</i>	<i>Clone</i>	<i>Marca</i>	<i>Diluição</i>	<i>Kit secundário</i>	<i>Tempo DAB</i>
p53	nuclear	NCL-p53-CM1	Novocastra	1:1000	Envision	3'
PCNA	nuclear	PC10	Novocastra	1:100	Envision	5'
Caspase-3 clivada	nuclear	ASP 175	Cell Signaling	1:200	Envision	5'

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

Para incubação do anticorpo secundário foi utilizado o Kit Envision (Dako K4065) durante 40 minutos em temperatura ambiente.

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

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

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

Nas baterias de imunistoquímica foi processada uma lâmina de controle negativo onde foi suprimido o anticorpo primário na incubação, e imunoglobulinas de camundongo (Dako, X0903) e coelho (Dako, X0903).

As análises imunistoquímicas de p53, PCNA e caspase-3 foram realizadas avaliando o percentual de células marcadas em 300 células, em aumento de 400x com auxílio do programa de análise de imagens QWin v3,0 Leica e uma câmera digital Leica DFC acoplada a um microscópio Leica DMLD. Procedeu-se a captura dos campos e as avaliações foram feitas como descrito a seguir.

Para a avaliação do percentual de positividade foram contados 300 hepatócitos consecutivos, independente da imunomarcação positiva ou negativa, no aumento de 400x, iniciando-se a contagem a partir do canto esquerdo inferior até o canto direito superior, completando o campo todo, sendo assinalados os que apresentavam reação positiva e negativa separadamente, como pode ser observado na Figura 2. Assim procedeu-se até a totalização de 300 células.

Foram evitadas áreas com fibrose difusa e necrose com intuito de evitar a contagem de célula inflamatórias imunomarcadas e focos de ligação inespecífica da peroxidase endógena o que dificultaria a identificação de células positivas.

Especialmente para a marcação de PCNA só foram contadas as células com marcação nuclear forte.

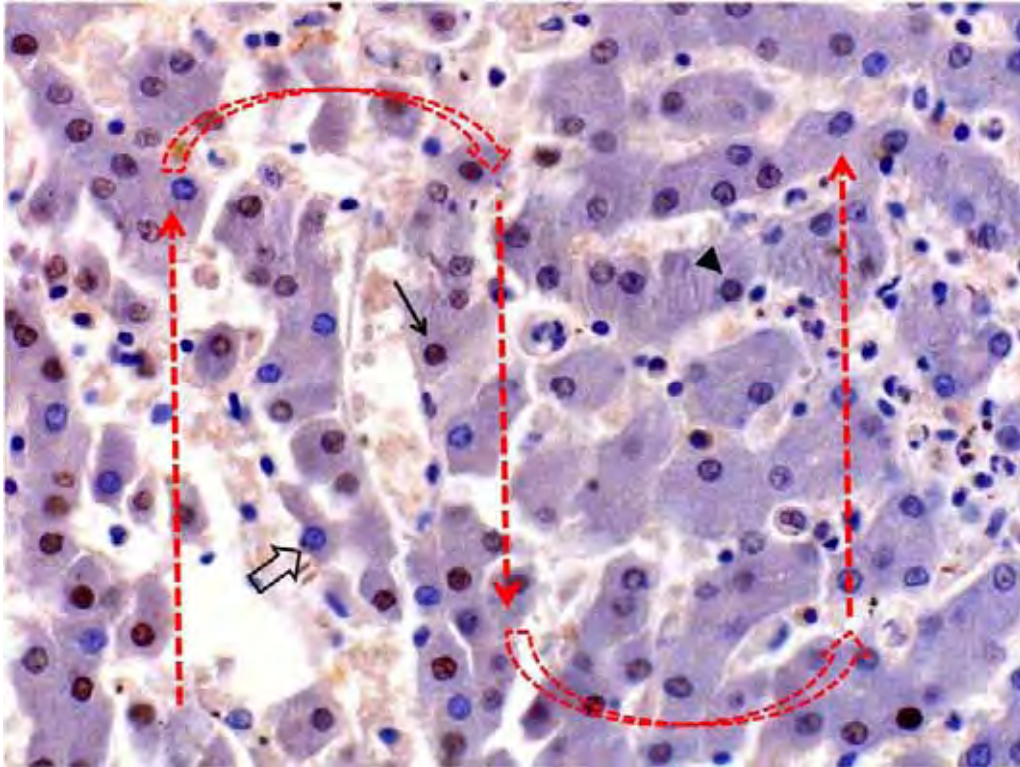


FIGURA 2 – Fígado de cão: Esquematização da contagem de células positivas. Célula apresentando marcação nuclear fortemente positiva (seta), célula apresentando marcação nuclear fraca, não contada (cabeça de seta), célula negativa (seta vasada). Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contra-coloração Hematoxilina Obj 40X.

4. RESULTADOS

4.1 Dados epidemiológicos

Os cães incluídos no experimento, totalizando 38 animais, apresentavam média de idade de 5,6 anos e uma distribuição quanto ao sexo com predominância de animais do gênero masculino, sendo 18 fêmeas (47,3%) e 20 machos (52,7%). Houve uma predominância dos animais sem raça definida totalizando 11 casos. Na tabela 2 estão expressas a distribuição das raças e o percentual em relação ao número de casos analisados.

TABELA 2. Distribuição das raças de cães em 38 casos de hepatite crônica

Raça	Número de animais	Percentual
Sem raça definida	11	28,9
Doberman Pincher	5	13,1
Cocker Spaniel Americano	5	13,1
Pastor Alemão	5	13,1
Fila Brasileiro	4	10,6
Boxer	2	5,3
Husky Siberiano	2	5,3
Labrador	2	5,3
Rottweiler	2	5,3

4.2 Avaliação histológica

Das 38 amostras analisadas 21 (55,3%) foram diagnosticadas como cirrose (grau 4 de fibrose) e 17 (44,7%) receberam o diagnóstico de hepatite crônica (graus 1, 2 e 3 de fibrose e graus variados de inflamação).

As lesões apresentaram graus de fibrose e inflamação variados como se evidencia na tabela 3 e figuras 3,4,5 e 6.

Quanto à inflamação foi observado um predomínio de células mononucleares, principalmente linfócitos e macrófagos, havendo escassa presença de plasmócitos nos graus 1 e 2 e significativa nos graus 3 e 4. (Tabela 3 e figura 4, 5, 6, 7 e 8) .

TABELA 3. Distribuição dos escores de atividade histológica por critério avaliado em números absolutos e percentuais.

Grau	Fibrose		Infiltrado inflamatório	
	n	%	n	%
1	6	15,8	4	10,5
2	6	15,8	7	18,5
3	8	21	8	21
4	17	47,4	19	50

A atividade inflamatória predominou nos espaços porta, mas também foi constatada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear lobular (*spill-over*) (Figuras 7, 8 e 12 C) predominantemente difuso e severo nos casos classificados como grau 3 e 4.

Os diferentes graus de fibrose estão representados nas figuras 9, 10, 11, 12. Nos cortes que apresentavam graus mais elevados de fibrose (3 e 4) constatou-se proliferação de ductos biliares variando de moderada à intensa, sendo que alguns ductos apresentaram algum grau de atipia reacional caracterizada por perda da polaridade celular e presença de nucléolos (Figura 13 E). Graus variados de colestase também foram identificados, principalmente nos casos mais avançados de fibrose (Figura 13 D)

Na maioria dos casos não puderam ser evidenciados hepatócitos isomórficos, sendo que as principais alterações encontradas foram desarranjo trabecular, lesões degenerativas, macro e micro-goticular, focos de necrose e nos graus mais elevados de fibrose observou-se a formação de nódulos de regeneração. Em dois casos foram encontrados, no interior dos nódulos de regeneração, grupos de hepatócitos com citoplasma claro e amplo, típicos de focos de células claras (Figura 13 F).

FIGURA 3. Percentual de casos de hepatite crônica distribuídos entre os graus de fibrose.

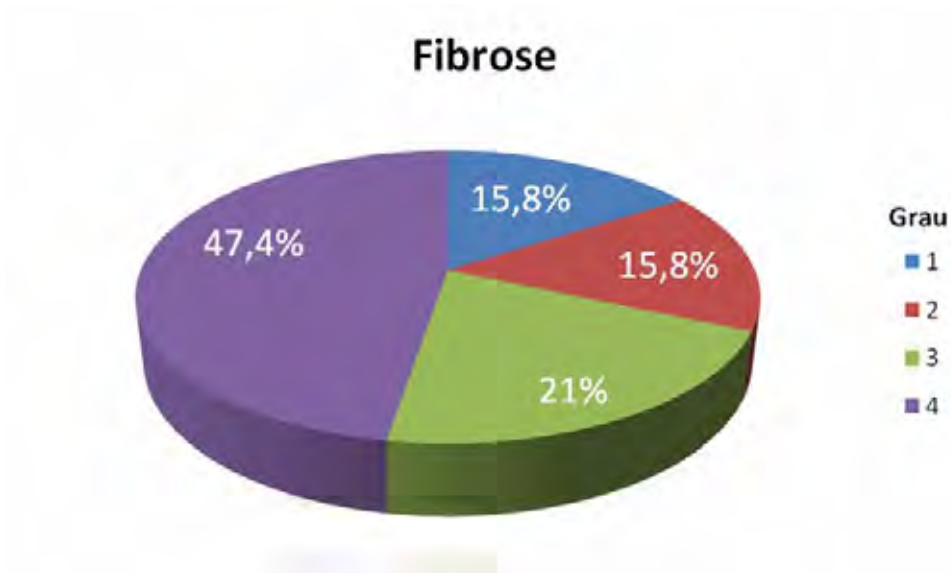


FIGURA 4. Percentual de casos de hepatite crônica distribuídos entre os graus de infiltrado inflamatório.



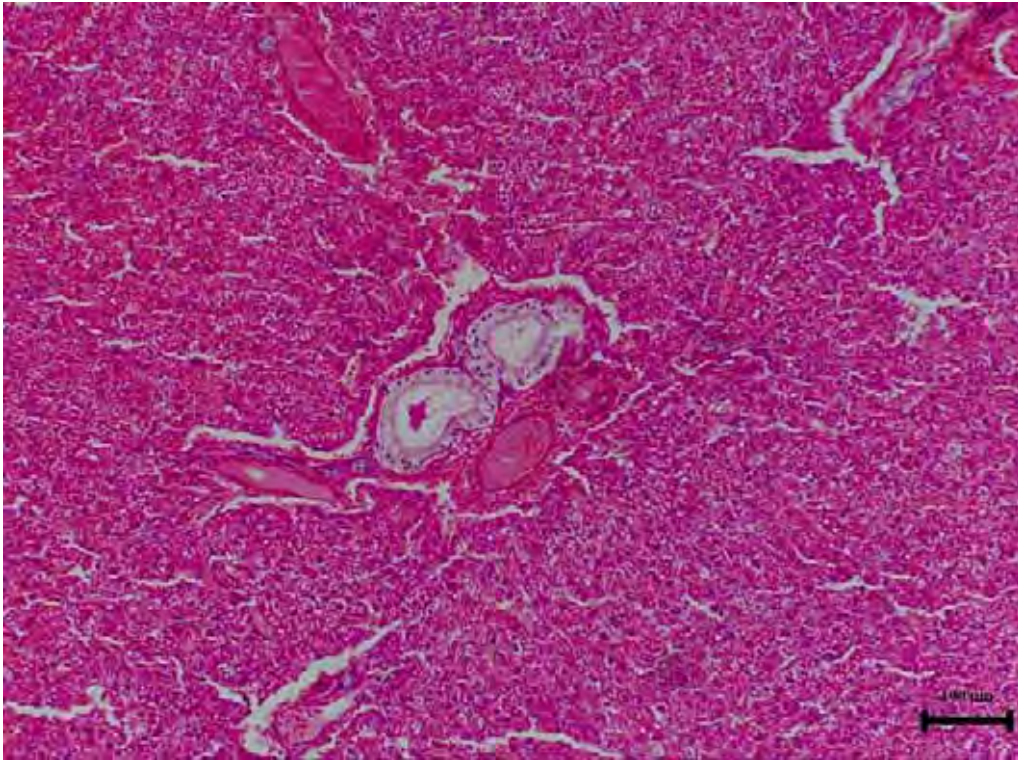


FIGURA 5. Fígado de cão: Grau 1 de infiltrado inflamatório- Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal discreto. HE. (Barra 100 μ m).

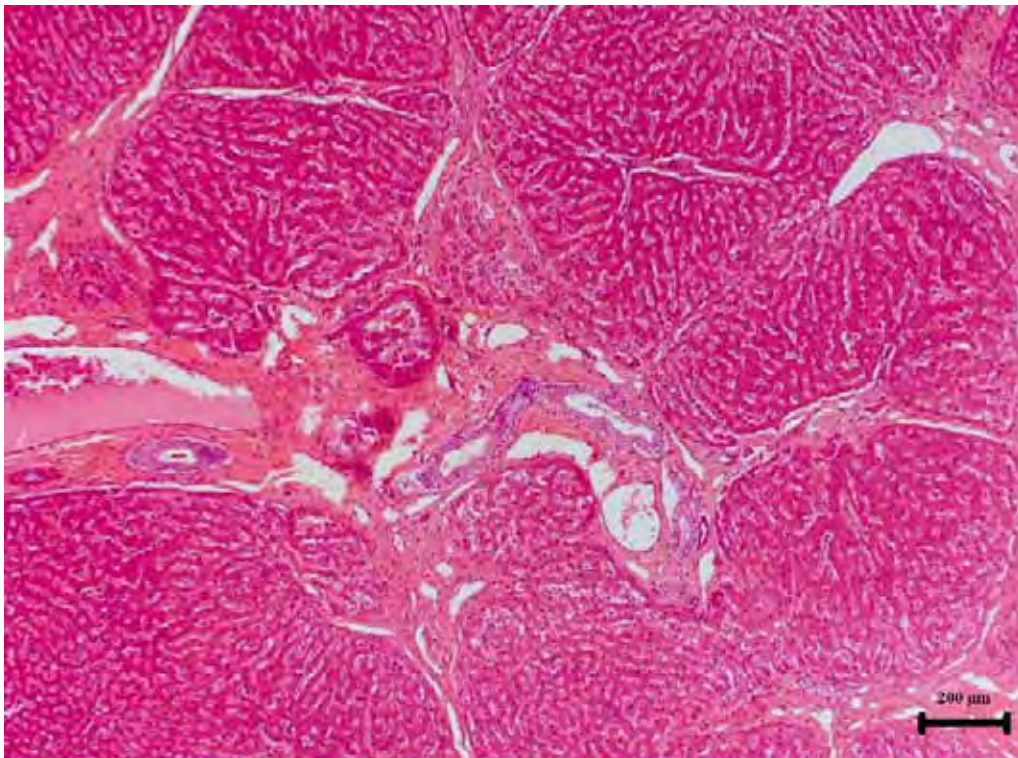


FIGURA 6. Fígado de cão: Grau 2 de infiltrado inflamatório. Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal moderado, em meio a pontes de fibrose porto-portais. HE. (Barra 200 μ m)

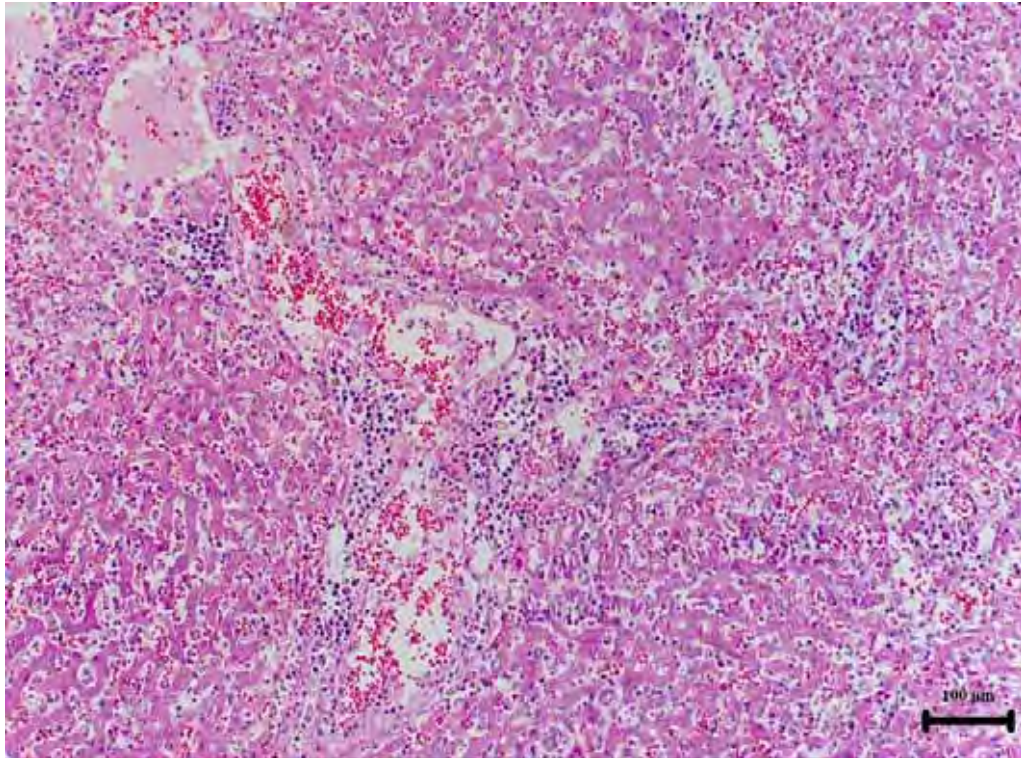


FIGURA 7. Fígado de cão: Grau 3 de infiltrado inflamatório - Infiltrado inflamatório mononuclear peri-porta e parenquimal marcante, com destruição da placa limitante e desarranjo das traves e hepatócitos. HE. (Barra 100µm)

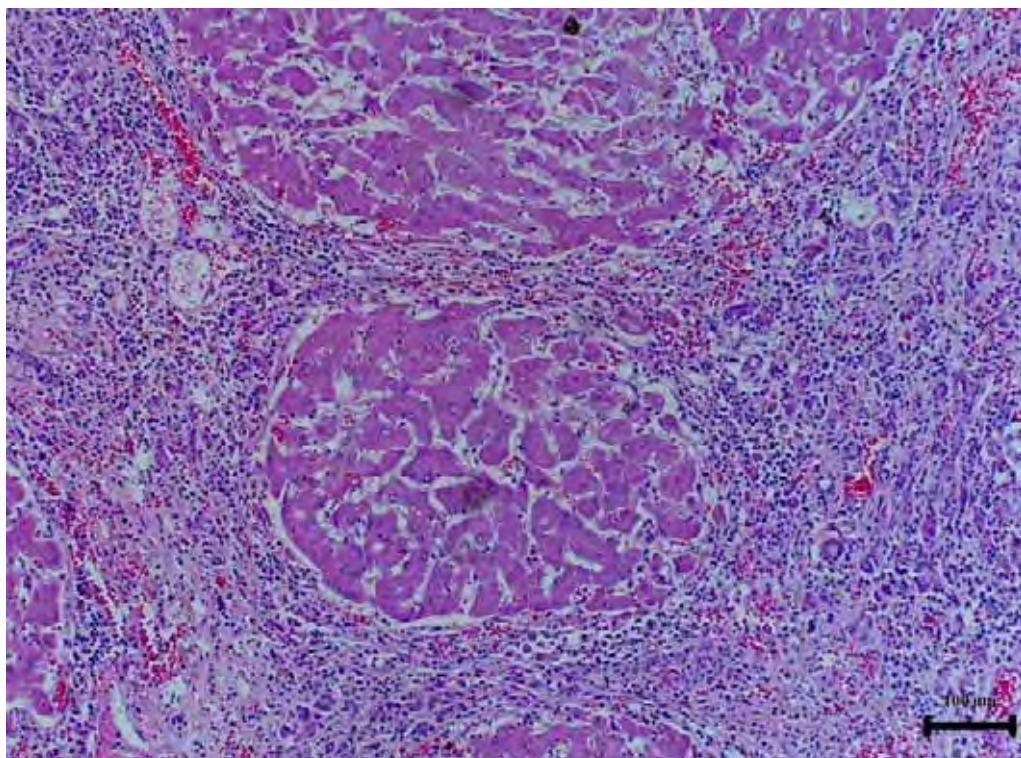


FIGURA 8. Fígado de cão: Grau 4 de infiltrado inflamatório – Infiltrado inflamatório mononuclear severo acompanhando a fibrose intensa do parênquima ao redor de um nódulo de regeneração formado. HE. (Barra 100µm)



FIGURA 9. Fígado de cão: Grau 1 de fibrose– Fibrose discreta confinada aos espaços porta evidenciada pela expansão fibrosa dos mesmos. Tricrômico de Masson. (Barra 100 μ m)

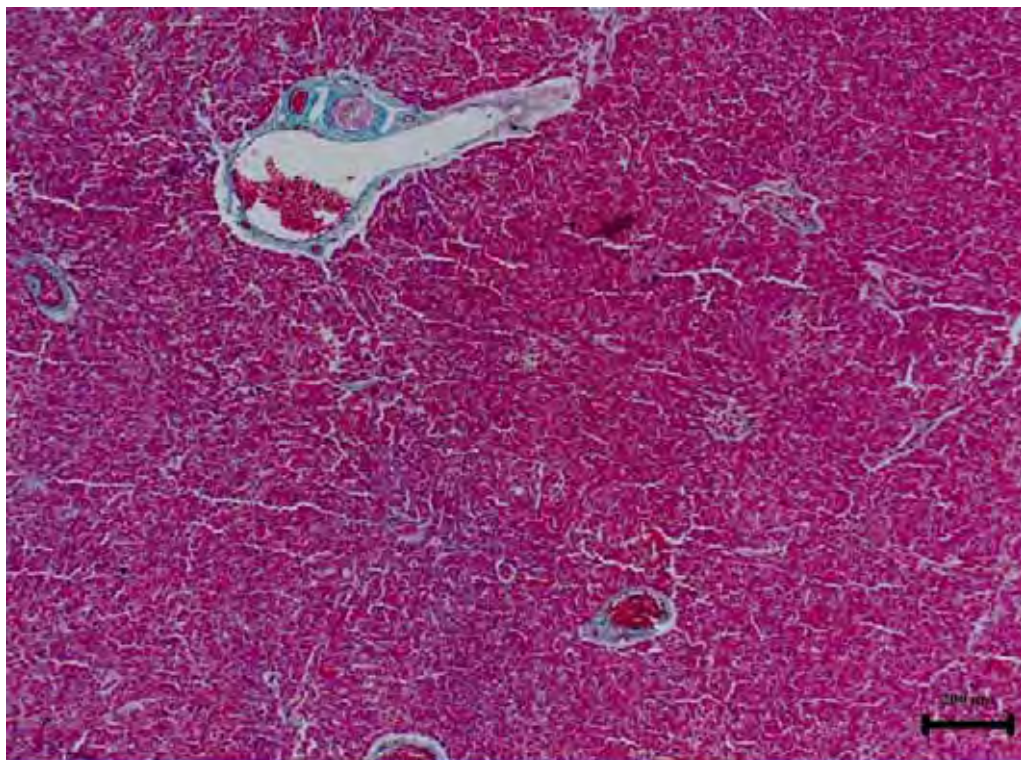


FIGURA 10. Fígado de cão: Grau 2 de fibrose – Fibrose moderada com expansão fibrosa dos espaço porta e início de formações de pontes porto-portais. Tricrômico de Masson. (Barra 200 μ m)

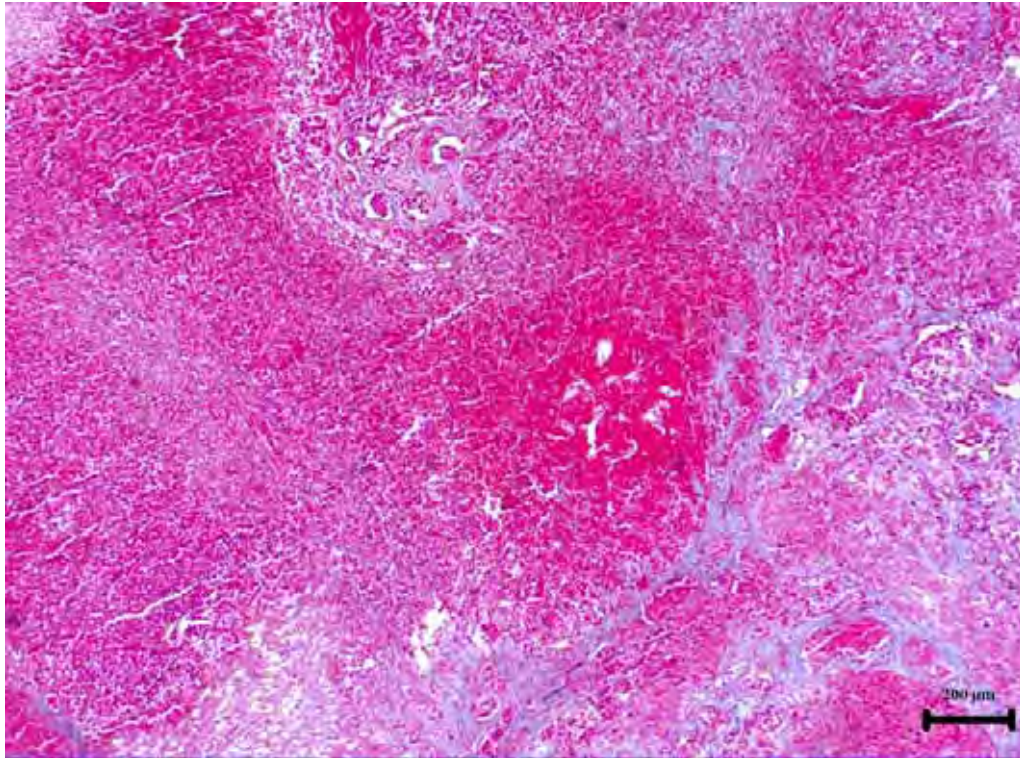


FIGURA 11. Fígado de cão: Grau 3 de fibrose – Perda parcial da arquitetura lobular com fibrose marcante, formação de septos porto-portais e porto-centrais e aparecimento de esboços de nódulos. (Barra 200 μ m)

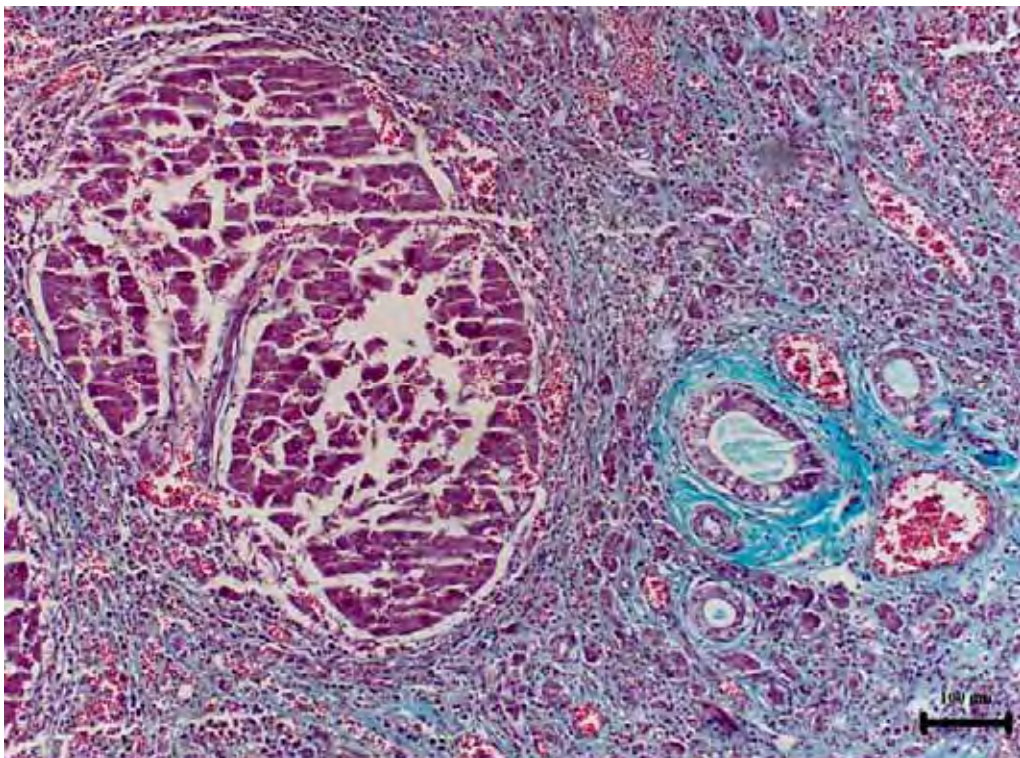


FIGURA 12. Fígado de cão: Grau 4 de fibrose – Cirrose com intensa proliferação de tecido conjuntivo, proliferação de ductos biliares, congestão e formação de um nódulo regenerativo. Tricrômico de Masson. (Barra 100 μ m)

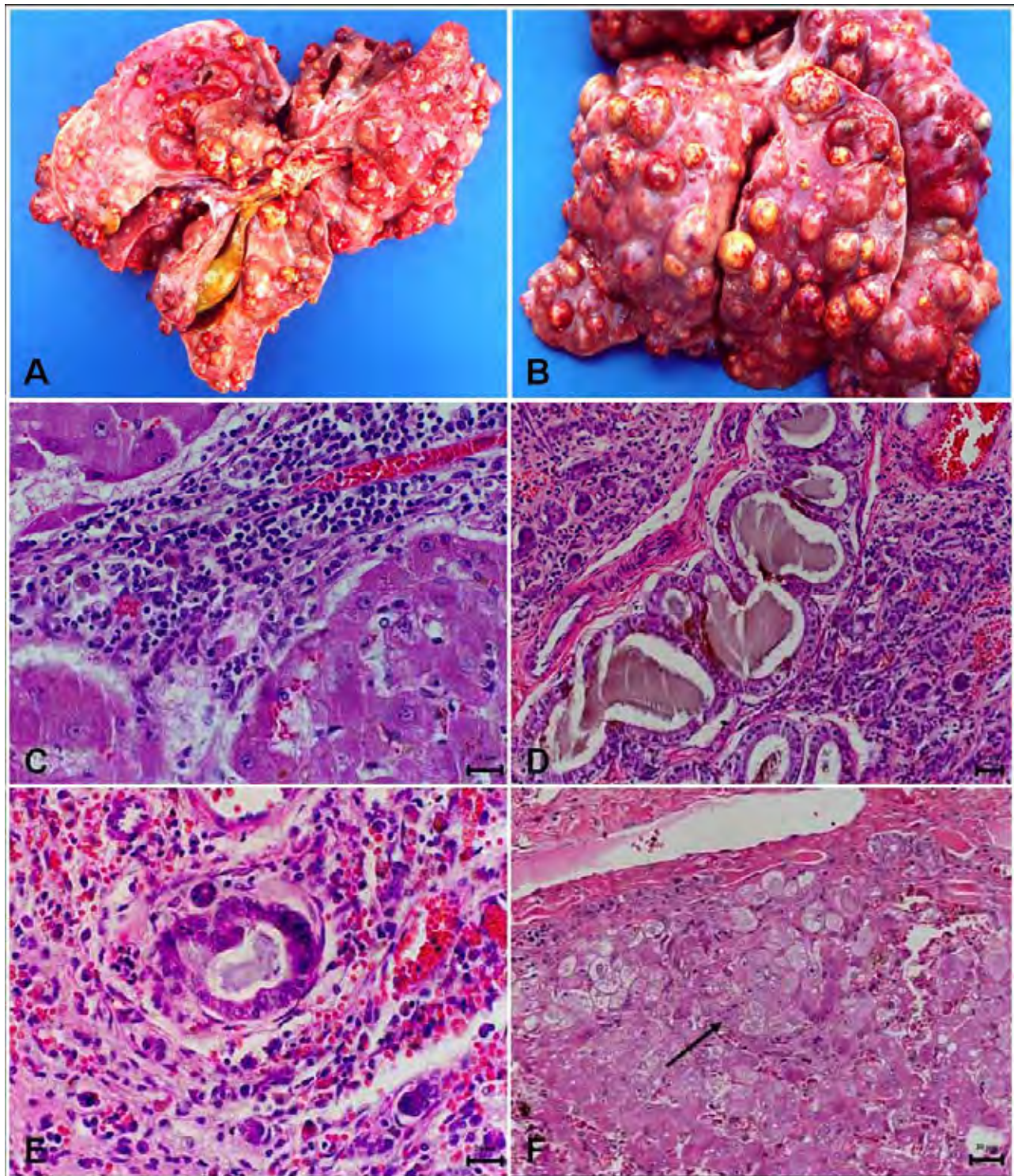


FIGURA 13. Fígado de cão: A. aspecto macroscópico da face visceral de um caso de cirrose hepática B. Face diafragmática do mesmo caso de A mostrando em detalhe nodulações do parênquima C. Infiltrado inflamatório mononuclear peri-portal se disseminando para região lobular. HE. D. Colestase intra-ductal marcante em um caso de cirrose, acompanhada de proliferação de ductos biliares. HE. E. Ducto biliar apresentando atipias reacionais: hiper celularidade, perda da polaridade celular e nucléolos evidentes. HE. F. Foco de células claras (seta) em um nódulo de regeneração de um caso de cirrose (Barra 20µm), Fotos A e B cedida pelo Dr. Raimundo Alberto Tostes de casos que fazem parte deste trabalho.

4.3 Análises imunoistoquímica

A marcação das células em proliferação pelo o anticorpo PCNA foi nuclear e os percentuais de marcação diferiram entre os grupos conforme tabela 5. Algumas poucas células apresentavam marcação tanto nuclear como citoplasmática, mas foram consideradas positivas apenas as que apresentam o núcleo fortemente marcado como já mencionado no item material e métodos.

No fígado normal a porcentagem de células marcadas positivamente pelo anticorpo PCNA foi de 14,6% (figura 14), no grupo das hepatites crônicas foi de 50,51% (figura 15) e no carcinoma hepatocelular foi de 47,3% (figura 16) como se evidencia na tabela 5 e na figura 27. O padrão de marcação de PCNA não diferiu entre os grupos, sendo que a marcação citoplasmática só foi observada no carcinoma hepatocelular (Figura 16). Observou-se também marcação positiva em nódulos de regeneração (Figura 17A) e em algumas células ductais biliares, principalmente em áreas de fibrose mais avançada (figura 17B).

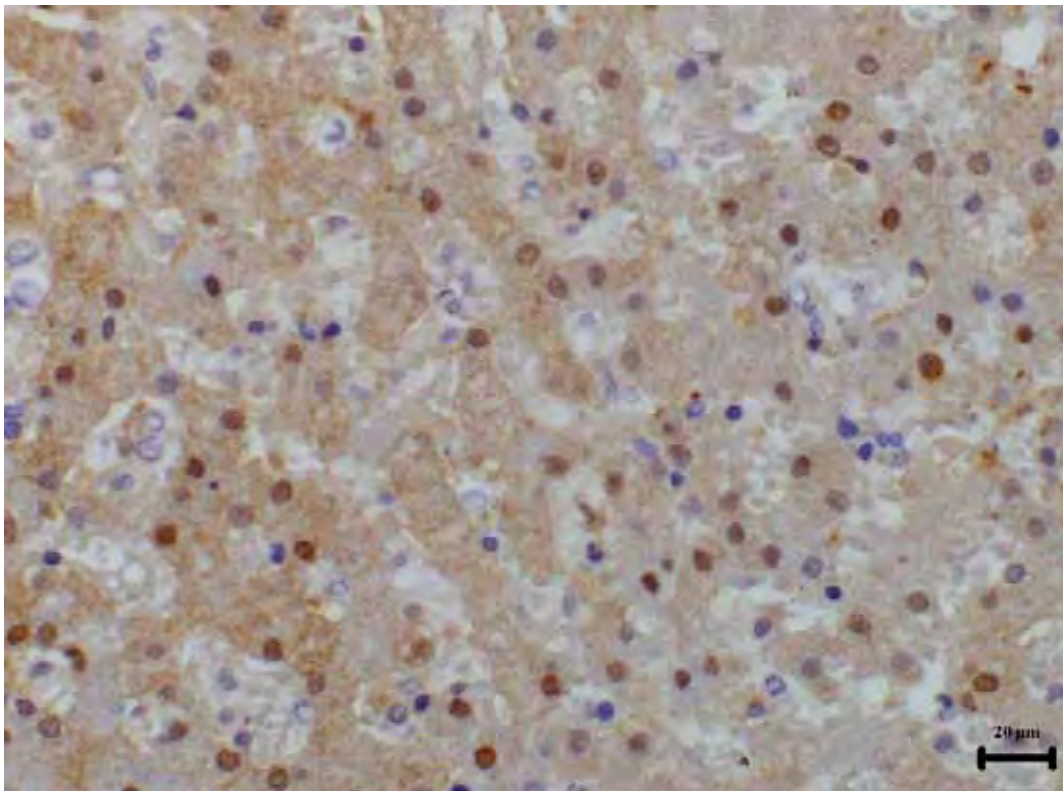


FIGURA 14 - Fígado de cão: Fígado normal. Imunomarcção positiva em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 20 μ m).

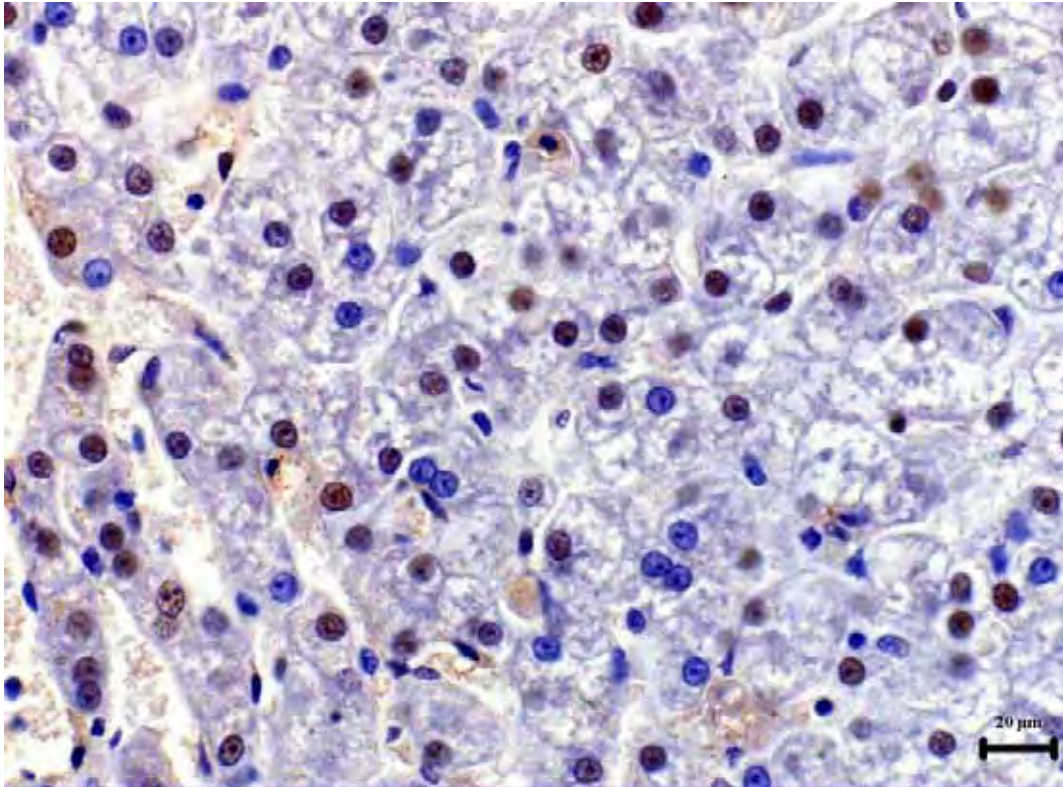


FIGURA 15 - Fígado de cão: Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 20 μm).

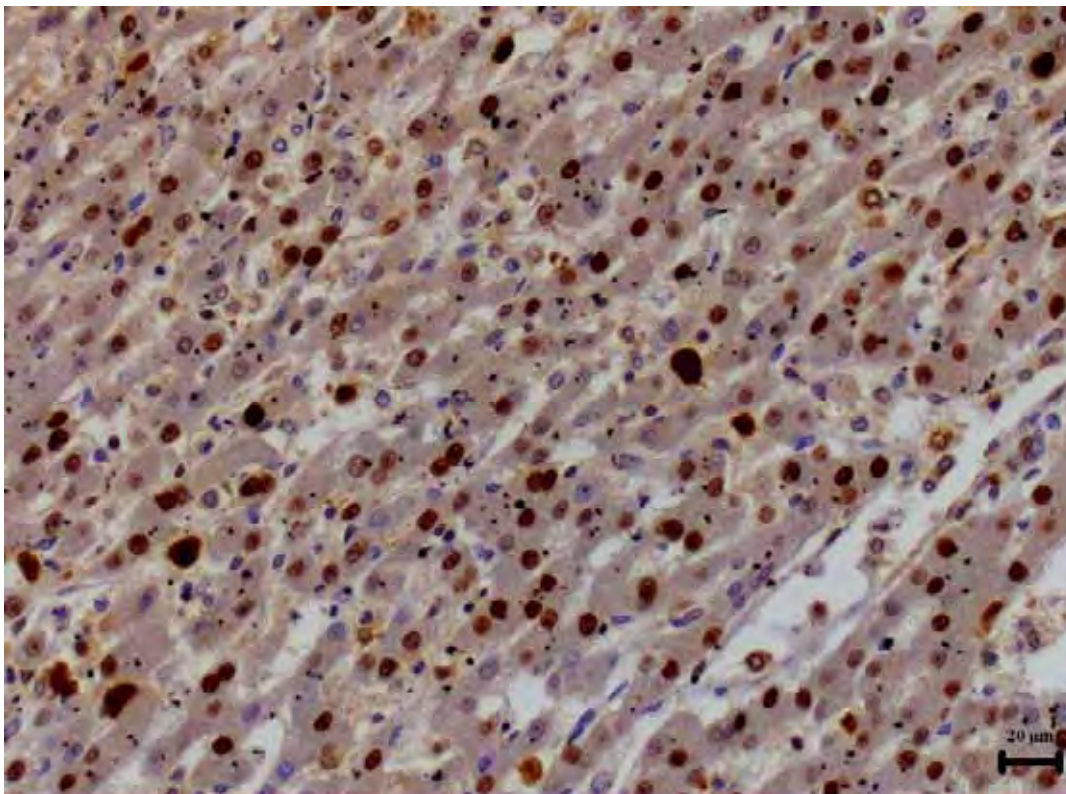


FIGURA 16 - Fígado de cão: Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção nuclear positiva e forte em hepatócitos neoplásicos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 20 μm).

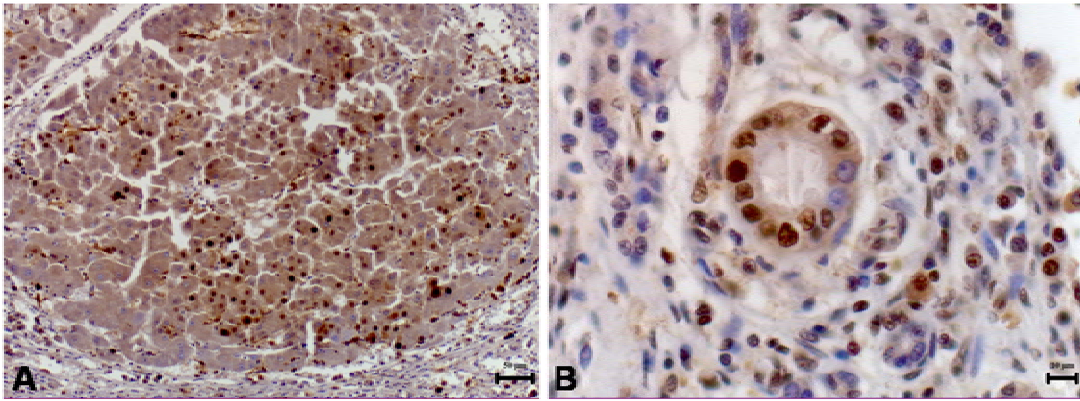


FIGURA 17 - Fígado de cão: Hepatite Crônica. A. Imunomarcção nuclear positiva e em hepatócitos de um nódulo regenerativo de um caso de cirrose (Barra 50µm). B. Imunomarcção positiva das células ductais biliares demonstrando a proliferação de células ductais biliares em áreas de fibrose (Barra 10µm). Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário PCNA, DAB, contracoloração hematoxilina.

A marcação para o anticorpo caspase-3 mostrou-se exclusivamente nuclear (Figuras 18, 19 e 20). Os percentuais de marcação diferiram pouco entre o fígado normal e as hepatites crônicas, mas quando comparados ao carcinoma hepatocelular houve maior diferença (Tabela 5 e Figura 27). Os percentuais de marcação foram 29,3% para o fígado normal 25,13% para as hepatites crônicas e 0,1 % para o carcinoma hepatocelular.

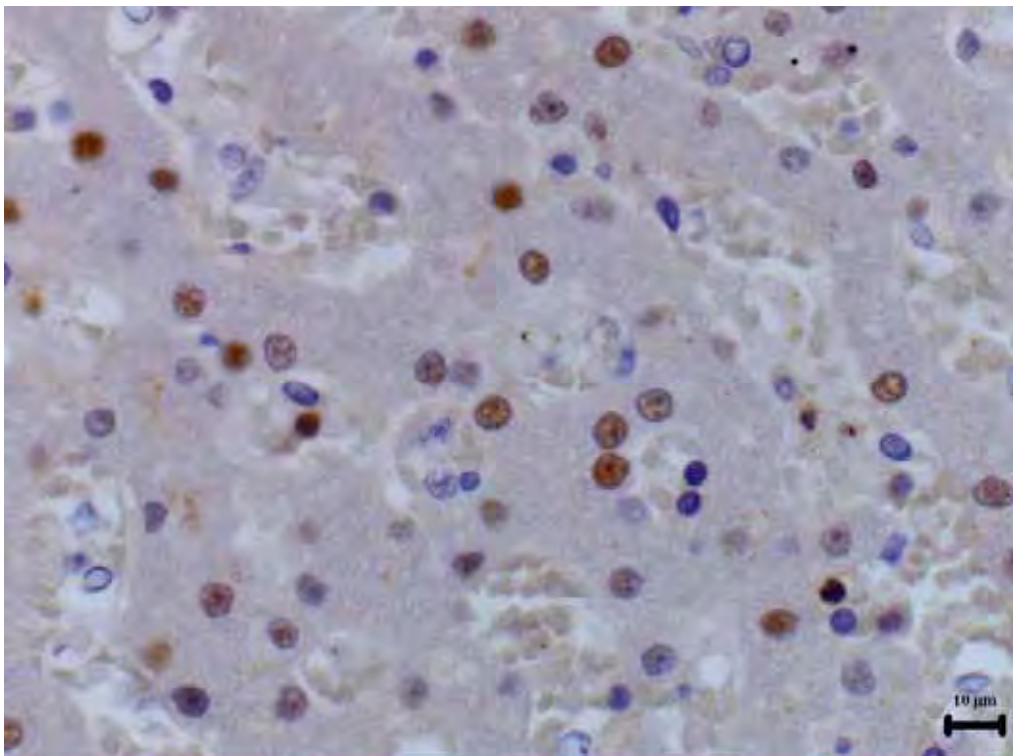


FIGURA 18 - Fígado de cão: Fígado normal. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 10µm).

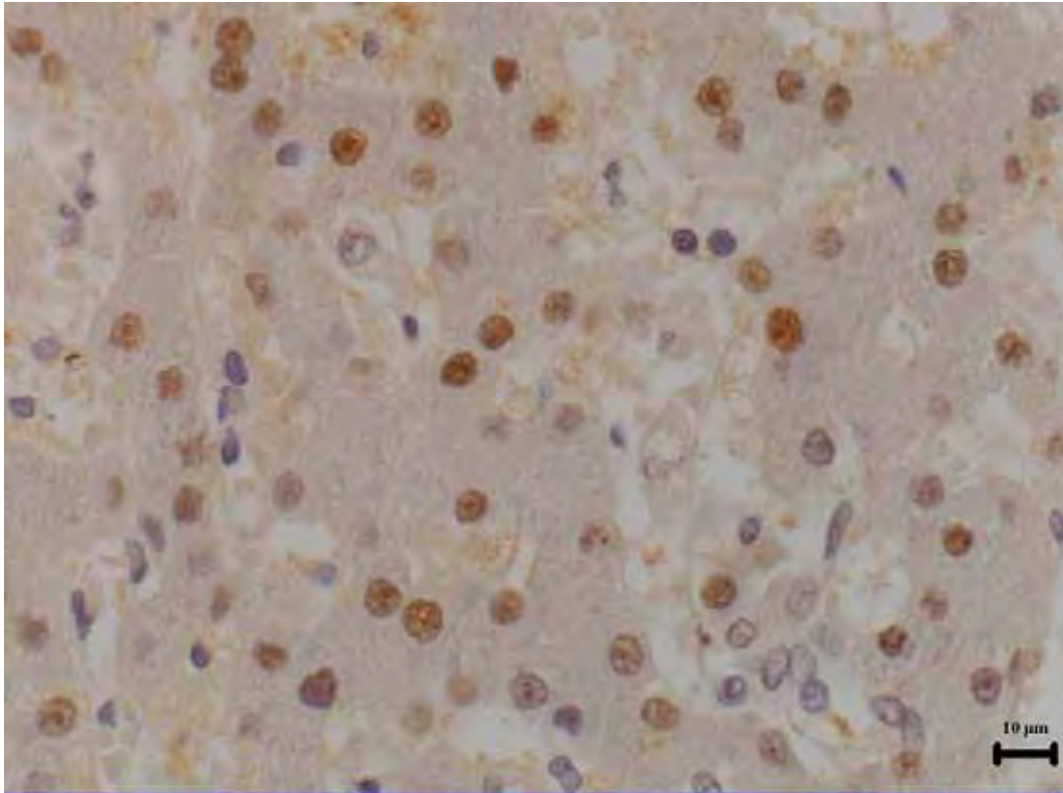


FIGURA 19 - Fígado de cão: Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 10 μ m).

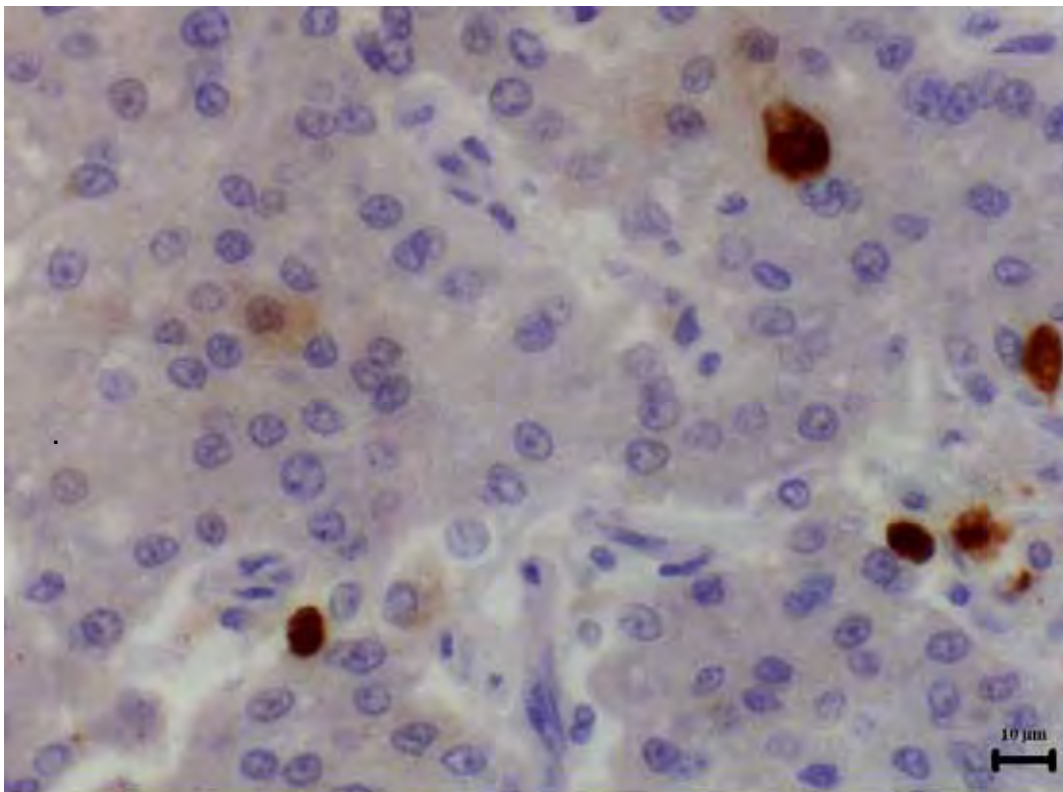


FIGURA 20 - Fígado de cão: Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção positiva nuclear forte em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário caspase-3, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 10 μ m).

Quanto a marcação do anticorpo p53, assim como as outras, apresentou um padrão nuclear (Figuras 21, 22 e 23). As porcentagens de marcação diferiram progressivamente entre os grupos sendo que o fígado normal não apresentou positividade para p53, as hepatites crônicas apresentaram uma média de percentual de positividade de 15% e o carcinoma hepatocelular uma média de 19,6%, como observado na tabela 5 e figura 27.

Os graus de fibrose e infiltrado inflamatório e as médias de marcação dos três anticorpos para cada caso de hepatite crônica estão expressa na tabela 4.

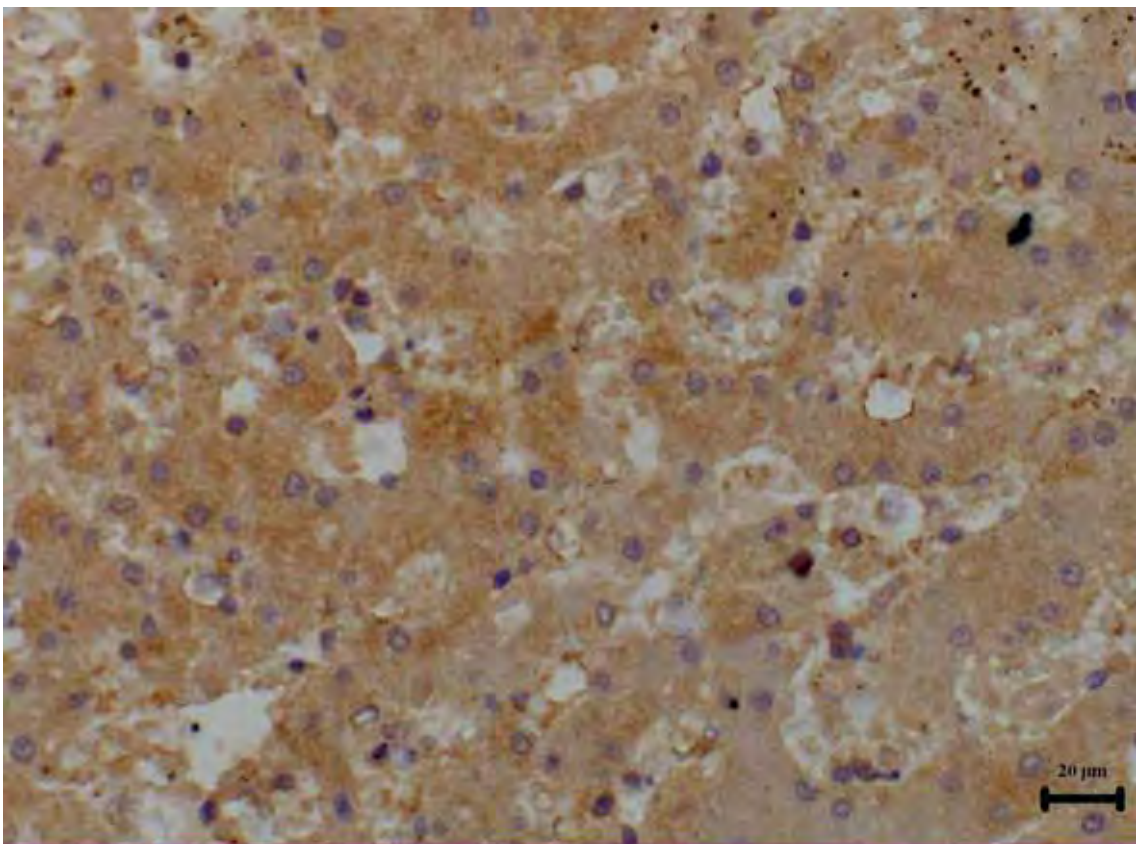


FIGURA 21 - Fígado de cão: Fígado normal imunomarcção negativa Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 20μm).

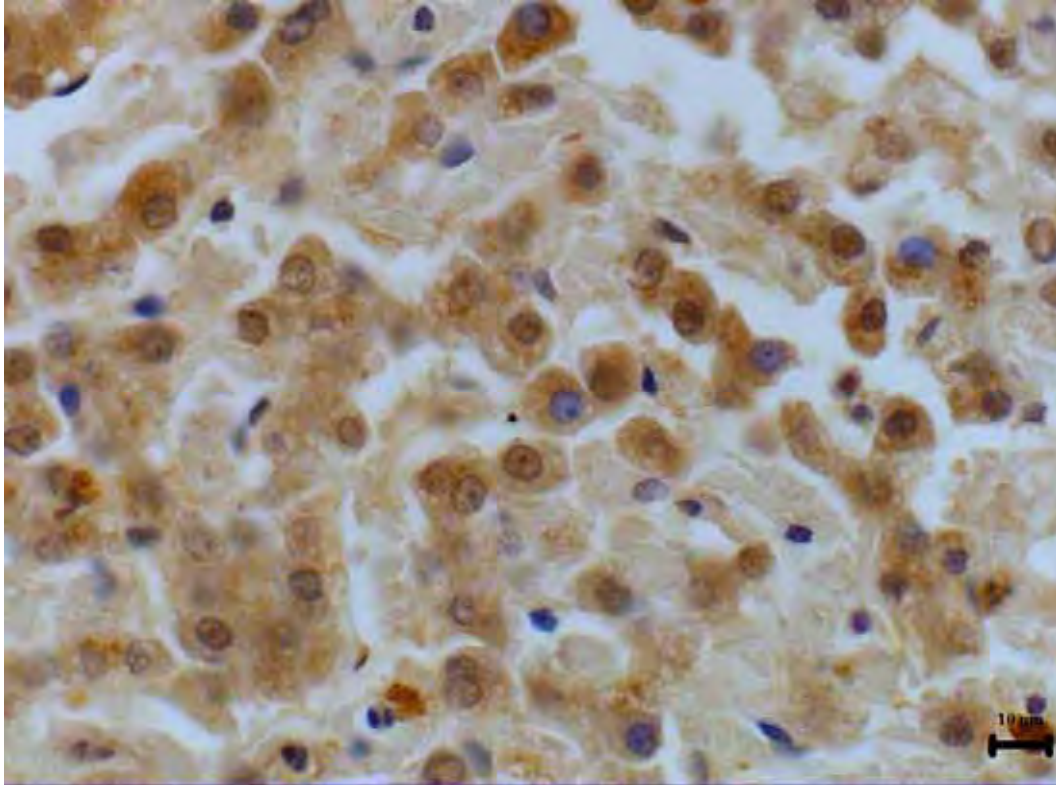


FIGURA 22 - Fígado de cão: Hepatite crônica. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina (Barra 10 μ m).

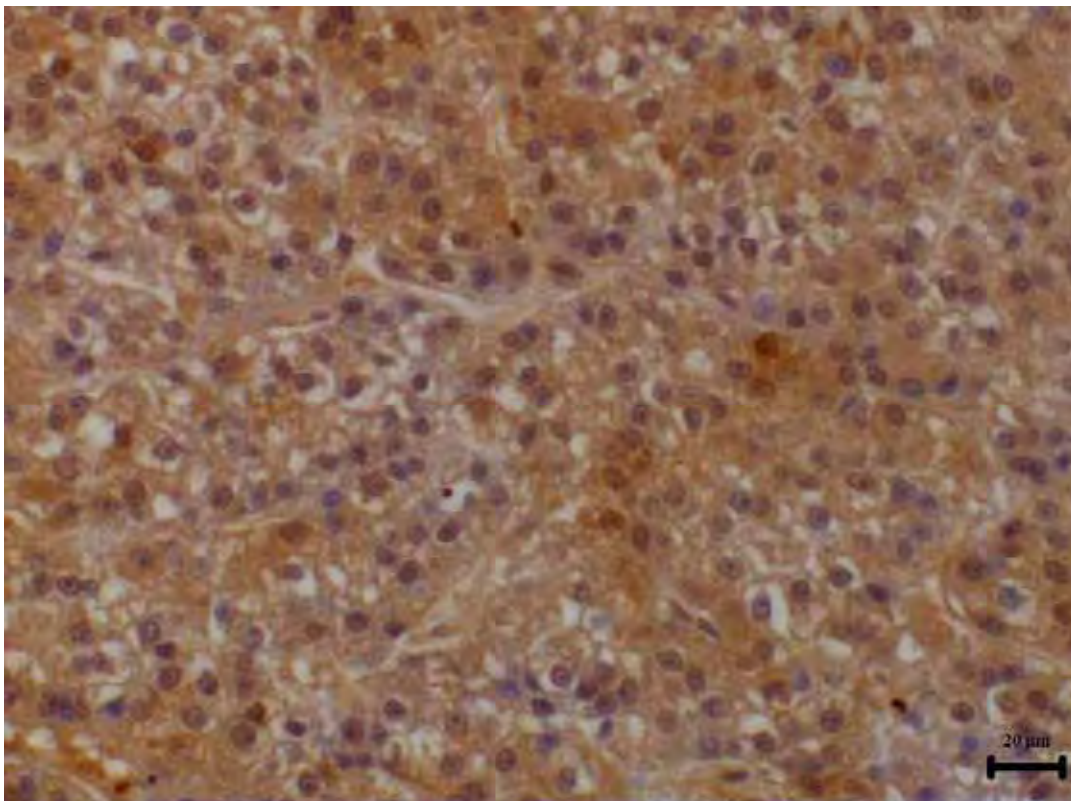


FIGURA 23 - Fígado de cão: Carcinoma hepatocelular. Imunomarcção positiva nuclear em hepatócitos. Imunoistoquímica, Envision, anticorpo primário p53, DAB, contracoloração hematoxilina(Barra 20 μ m).

TABELA 4. Graus de fibrose e inflamação e percentagem de células marcados pelos diferentes anticorpos nos diferentes casos de hepatites crônica.

Caso	Fibrose Grau	Inflamação Grau	p53 %	PCNA %	Caspase %
P 202/96	4	4	0	70,6	47
P 212/96	2	3	0	89,3	52
P 225/96	4	4	13,3	37	66,3
P 276/96	3	4	0	67	53,3
P 537/96	1	2	0	62,3	39,3
P 28/97	2	2	13,6	70	37,3
P 30/97	2	3	54,3	66	49,6
P 51/97	2	1	41	51	46,6
P 57/97	4	2	28,3	66	43,6
P 61/97	3	4	39	39	3,6
P 63/97	2	1	0	61,3	47,6
P 153/97	1	2	17,3	83,6	29,6
P 154/97	1	1	44,6	59,6	5
P 184/97	1	2	51,3	11	32,6
P 233/97	1	1	49,3	54	25
N 531/99	3	3	18,3	39,6	42
N 768/99	2	2	35	12,6	2,3
N 135/00	3	3	28	55,3	9
N 333/00	4	3	0	20	10,3
N 63/01	4	4	0	68,6	13,6
N 99/01	4	4	0	75,3	14,3
N 181/01	4	4	0	10	13,3
N 223/01	4	4	0	35	0
N 364/01	3	3	20,6	6,3	19
N 397/01	4	4	0	24	0
N 102/02	4	4	0	54,6	0
N 194/02	3	3	4	73	26,6
N 211/05	4	4	0	45	26,6
P 10	4	4	0	66	0
P 21	3	4	4,3		0
C1	4	4	0	63,3	17
MEL	4	4	0	27,3	14,6
B 60/01	4	4	53,6	75,3	37,6
N 162/02	4	3	0	76,6	19
CASO 32	1	2	0	47,6	26,6
PA 02/02	4	4	33	15,3	0
Labrador	3	4	0	53	45,6
Bud	4	4	21,3	37,6	39,3

A distribuição das porcentagens de marcação dos anticorpos PCNA, caspase-3 e p53 variou muito dentro do grupo das hepatites crônicas, o que fica evidenciado nas figuras 24, 25 e 26.

FIGURA 24. Distribuição da porcentagem de positividade para o anticorpo PCNA nos casos de hepatite crônica canina (n=38).

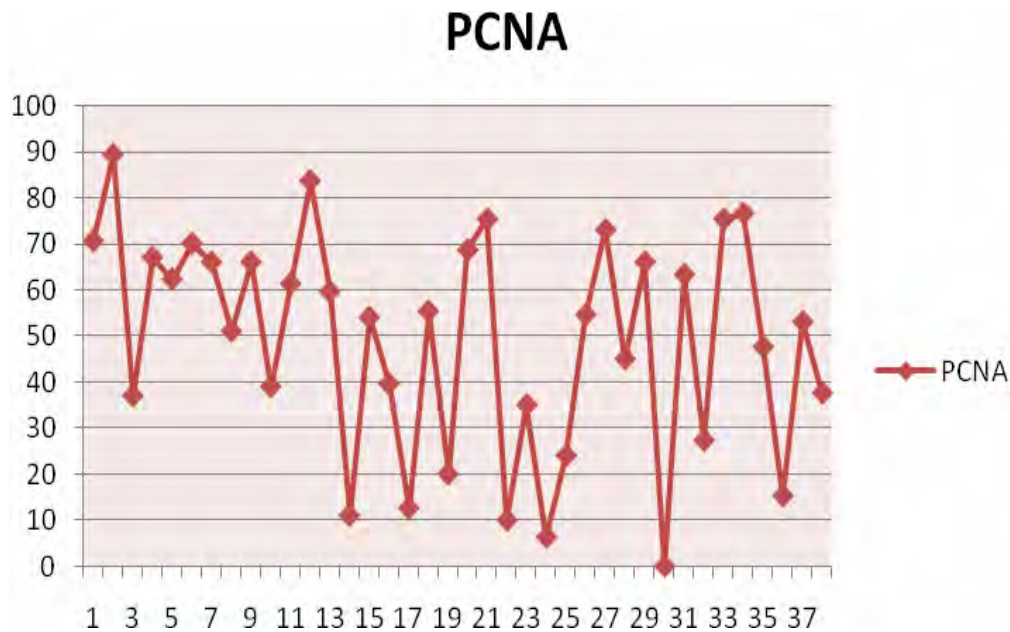


FIGURA 25. Distribuição da porcentagem de positividade para o anticorpo caspase-3 nos casos de hepatite crônica canina (n=38).

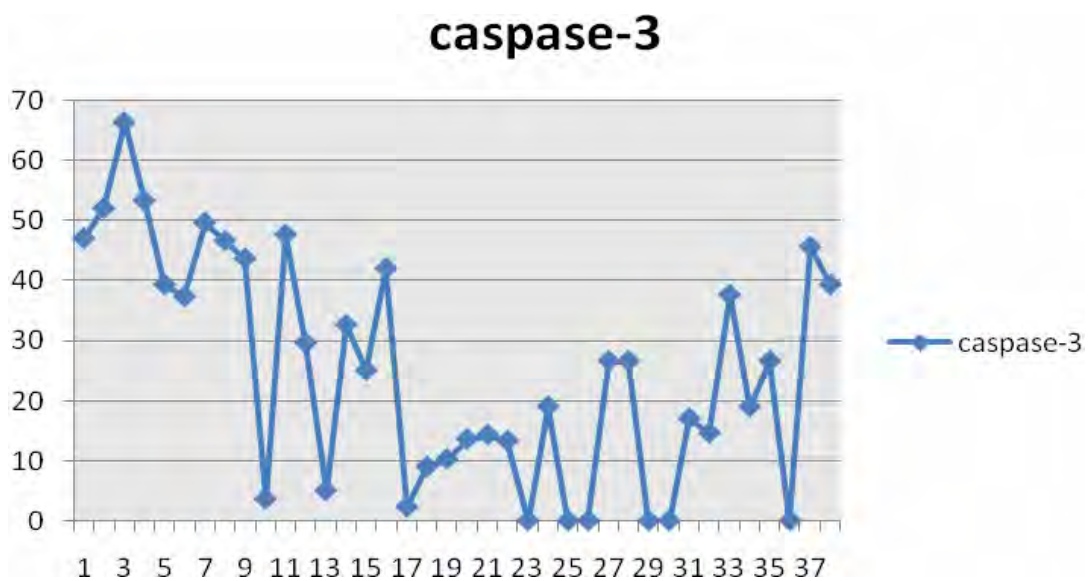


FIGURA 26. Distribuição da porcentagem de positividade para o anticorpo p53 nos casos de hepatite crônica canina (n=38).

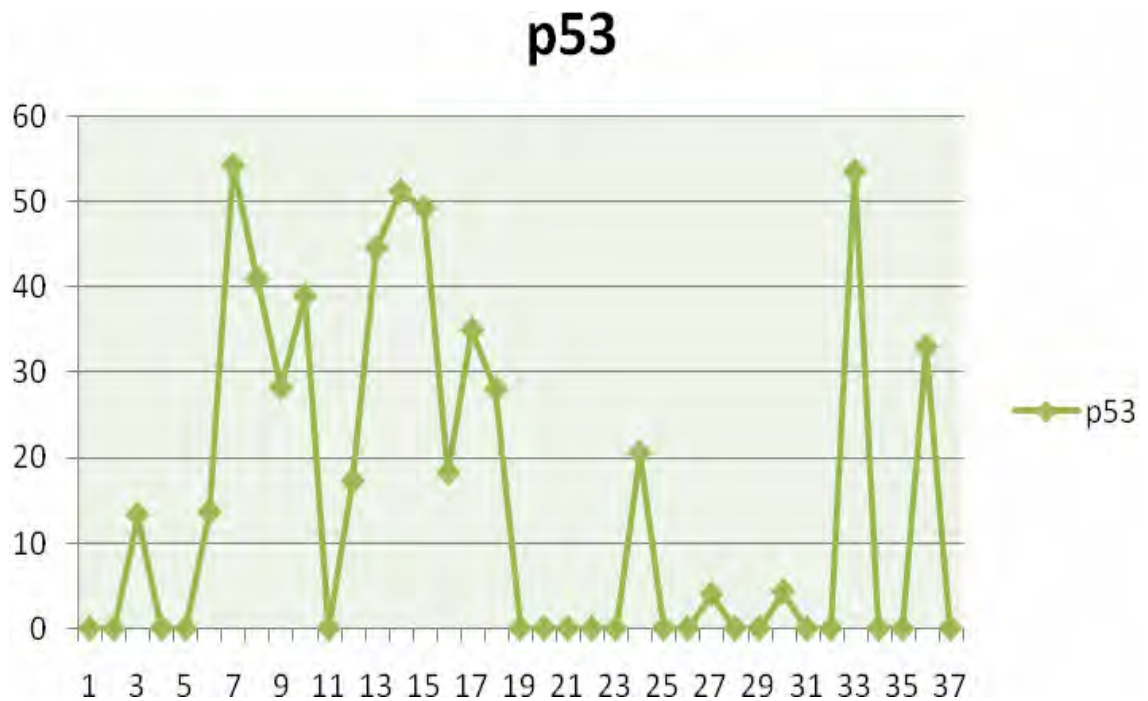
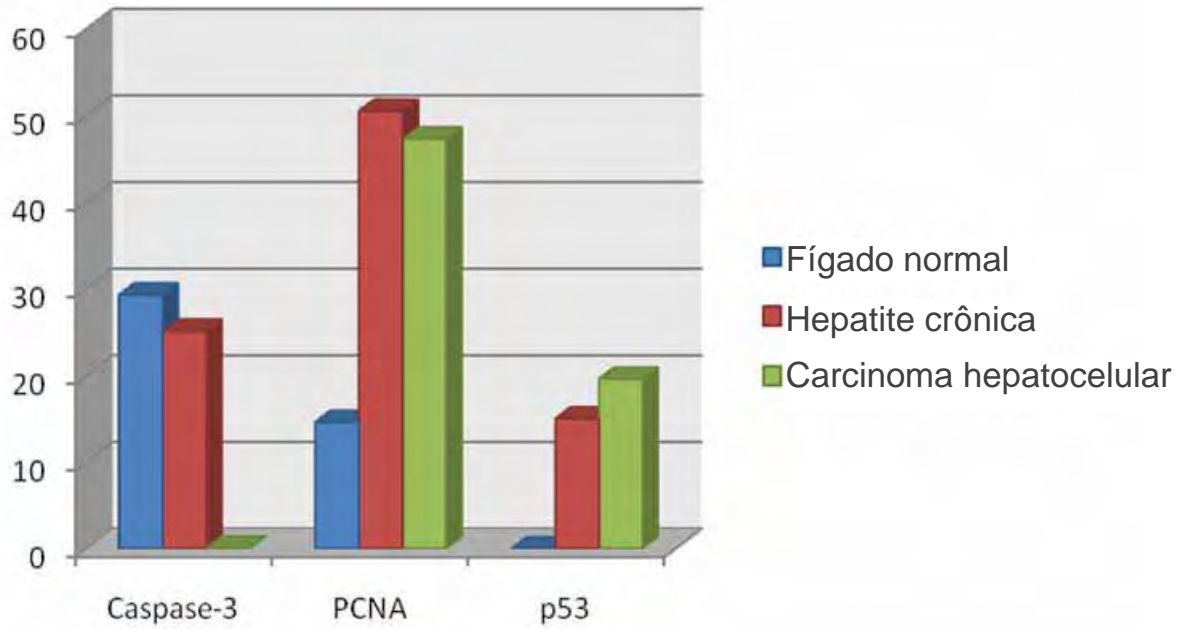


TABELA 5. Percentagem de células marcados pelos diferentes anticorpos nos diferentes grupos.

Grupo	Anticorpo		
	PCNA	Caspase-3	P53
Fígado normal	14,6	29,3	0
Hepatite crônica	50,51	25,13	15
Carcinoma hepatocelular	47,3	0,1	19,6

FIGURA 27 - Percentual de positividade para caspase-3, PCNA e p53 entre os diferentes grupos.



5. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a média de idade dos animais com hepatite crônica (5,6 anos) está de acordo com outros estudos publicados, onde as hepatites crônicas acometeram animais adultos de meia idade ou senis (ANDERSSON E SEVELIUS, 1991; BOISCLAIR et al., 1998).

As raças mais acometidas por quadros hepáticos crônicos neste trabalho foram os animais sem raça definida (28,9%), seguidos dos Doberman Pinschers (13,1%), Cocker Spaniel Americanos (13,1%) e Pastores Alemães (13,1%). Também estiveram representados os Boxers, Labradores, Husky Siberianos e Rottweillers.

A literatura refere marcante predisposição à hepatite crônica nas raças Doberman Pinscher, Cocker Spaniel Americano e Inglês, Retriever do Labrador, West Highland Terrier e outros (CENTER, 1995; SEVELIUS, 1995; ROTHUIZEN, 1997). Estes dados vêm de encontro com os resultados deste estudo, pois, excetuando os animais sem raça definida, que perfazem a maioria da população por uma questão sócio-cultural do ambiente em que o trabalho foi desenvolvido, raças como Cocker Spaniel Americano e Doberman Pinscher estão representadas. Estes dados são corroborados por pesquisas realizadas utilizando cães com hepatites crônicas em condições ambientais semelhantes (TOSTES, 2003), em que a ampla maioria era de animais sem raça definida.

Esta representação significativa de cães sem raça definida dilui a possibilidade de se estabelecer algum perfil de susceptibilidade racial.

A predisposição sexual às hepatites crônicas parece ter uma relação principalmente com a raça dos animais. Segundo ANDERSSON E SEVELIUS (1991), machos da raça Cocker Spaniel exibem maior tendência a desenvolver hepatite crônica, em contrapartida, fêmeas Labradores e Doberman Pinscher apresentam uma tendência maior que machos. Vários trabalhos apontam uma tendência a ser mais comum em fêmeas (CRAWFOR et al., 1985; FUENTEALBA et al., 1997; SPEETI et al., 1998; BOISCLAIR ET AL., 2001).

A predisposição sexual dos animais deste trabalho está de acordo com outro trabalho realizado com animais do mesmo perfil. Como no trabalho realizado por TOSTES (2003), em que a população de animais predominante foi de machos em relação a fêmeas, este também apresentou tal inclinação. Isto se deve principalmente à grande representatividade de animais sem raça definida neste estudo, o que difere este trabalho dos publicados na literatura internacional aonde a grande maioria dos animais eram de raças puras, exibindo assim as tendências de predisposição sexual associadas às raças já descritas anteriormente.

A análise dos graus de inflamação e fibrose dos casos de hepatite crônica revelou uma heterogeneidade muito grande do material. A maioria dos casos (55,3%) se enquadrou no grau 4 de fibrose e inflamação, que já constitui um quadro cirrótico. Observa-se também que a quantidade de casos com graduação menor (1 e 2), tanto para a fibrose quanto para inflamação foi pequena. Em relação ao grau de fibrose obtivemos 15,8% para grau 1 e 2. E quanto ao grau de inflamação, esse foi representado por 10,5% e 18,5% respectivamente. Este predomínio de casos mais avançados de inflamação e fibrose observado neste estudo, em que se utilizou fígados de cães sem história clínica de doença hepática, possivelmente se deve à insidiosidade destes processos e a dificuldade de se estabelecer um diagnóstico precoce nos quadros de hepatite crônica, o que leva a intervenções diagnósticas em um momento muito avançado da doença (CENTER, 1995).

Nas hepatites infecciosas, provocadas por *Leptospira sp* (BISHOP et al., 1979; ADAMUS et al., 1997) ou Adenovírus Canino Tipo-1 – CAV (RAKISH et al., 1986; CHOUINARD et al., 1998), a lesão hepatocelular pode evoluir insidiosamente por meses ou anos até manifestar alguma alteração clínica marcante (STROMBECK et al., 1998). Esta evolução silenciosa e insidiosa encontra forte paralelismo nas hepatites virais do tipo B e C em humanos (KAGE et al., 1997; FRIEDMAN, 1999; ZAITOUN et al., 2001).

Pela alta incidência de imunomarcção para Adenovírus Canino Tipo 1 – CAV1, observada por RAKISH et al. (1986) e TOSTES (2003), inclusive com amostras desse último trabalho fazendo parte deste estudo, ficamos altamente sugestionados em acreditar que haja um grande percentual de casos de etiologia viral no material estudado, o que corrobora com os

achados de grau de fibrose e infiltrado inflamatório observados. Não pudemos fazer uma correlação dos casos de fibrose grau 4 e inflamação grau 4, com a imunomarcção para adenovírus canino, pois novos casos foram incluídos neste estudo.

Nas hepatites virais humanas B e C a persistência de partículas virais antigênicas reconhecidamente provoca alterações hepatocelulares que culminam em alterações displásicas e neoplásicas. Sendo assim fica saliente a necessidade de se realizar a pesquisa de partículas virais neste material.

Como nas hepatites crônicas nos homens, observa-se no cão uma tendência clara de vários casos em evoluir de processos crônicos hepáticos mais brandos para alterações mais severas como a cirrose (SCHEUER, 2002).

Levando-se em consideração este paralelo já estabelecido pode-se inferir que marcadores imunoistoquímicos de proliferação, apoptose e expressão de alterações genéticas como p53, que são utilizados amplamente como fatores prognósticos em hepatites crônicas humanas (KRONENBERGER et al., 2000; SAFTOUI et al., 2003; GOWN & WILLINGHAM, 2002; AKYOL et al., 1999 e LOGUERCIO, et al., 2003), também se prestariam a este propósito no material canino.

As marcações imunoistoquímicas observadas para PCNA, caspase-3 e p53 se mostraram todas com um padrão nuclear, o que é relatado por vários outros autores (KRONENBERGER et al., 2000; SAFTOUI et al., 2003 e LOGUERCIO, et al., 2003).

Na marcação de PCNA, principalmente no carcinoma hepatocelular, existiram células que apresentaram também marcação citoplasmática. Isto, segundo SARLI et al. (1995) e SAFTOUI et al. (2003), ocorre especialmente em células em mitose, onde a carioteca se dissolve permitindo que as proteínas presentes no núcleo, inclusive o PCNA se difundam no citoplasma. Para fins de estabelecer as porcentagens de marcação imunoistoquímicas, só foram levadas em consideração as células com marcações nucleares.

Especialmente para o PCNA, além das células com marcação nuclear, só foram contadas as que apresentavam marcação nuclear forte. Este procedimento, segundo SARLI et al. (1995), tem objetivo de não superestimar a

quantidade de células em proliferação, pois o PCNA é uma proteína que apresenta meia vida longa e pode estar expressa em pequenas quantidades em células que já saíram do ciclo celular, levando a uma marcação mais fraca.

Em alguns casos de hepatite crônica mais avançada (graus de fibrose e inflamação 3 e 4) observou-se marcação positiva das células dos ductos biliares para PCNA. Este achado evidencia proliferação desse tipo celular, o que corrobora com a idéia de proliferação ductal biliar em resposta à compressão do sistema biliar e à conseqüente diminuição do fluxo de bile por tecido conjuntivo advindo da fibrose hepática (DILL-MACKY, 1995).

Quando comparamos as marcações dos anticorpos entre o grupo de hepatite crônica, o fígado normal e o carcinoma hepatocelular percebemos que existiram diferenças relevantes. Quanto à marcação por PCNA, evidenciamos que o grupo das hepatites crônicas apresentou média porcentual de células marcadas (50,51%) maior que a do fígado normal (14,6%) e maior, mas muito similar a porcentagem de proliferação do carcinoma hepatocelular (47,3%). Isto pode sugerir uma evolução desse processo onde a agressão sofrida pelo tecido hepático em associação com processos inflamatórios estimule essa proliferação.

A expressão de caspase-3 se mostrou menor no grupo das hepatites crônicas (25,13%) do que no fígado normal (29,3%) e foi quase nula no carcinoma hepatocelular (0,1%). Esse quadro pode demonstrar uma perda da capacidade de controle do ciclo celular com a evolução do processo, o que proporcionaria um aumento da quantidade de células de um tecido pela associação da diminuição da apoptose com aumento da proliferação.

Analisando a expressão imunoistoquímica do gene p53 mutante observamos que as porcentagens também exibiram uma progressão entre os grupos, onde o fígado normal não apresentou marcação, as hepatites crônicas apresentaram uma porcentagem média de 15% e o carcinoma hepatocelular uma média de 19,6%. A expressão de p53 tem sido estudada em hepatites crônicas e carcinomas hepatocelulares em humanos e mostrou uma correlação significativa com a proliferação celular e com a progressão das hepatites crônicas para o carcinoma hepatocelular (AKYOL et al., 1999; LOGUERCIO, et al., 2003). Sendo assim, este achado demonstra principalmente que com a instalação do processo de hepatite crônica ocorrem mutações no gene p53

assim como foi observado no carcinoma hepatocelular, e sendo assim estas células estão sujeitas a sofrerem danos genéticos que não serão reparados e também não entrarão em apoptose podendo originar alterações neoplásicas.

Porém como se pode observar nas figuras 16, 17 e 18 há uma grande variação na média da positividade para os três anticorpos testados. Essa variabilidade de médias mantém essa mesma característica mesmo quando agrupamos os casos pelo grau de fibrose ou inflamação.

Acreditamos que a interseção do grau de fibrose com o de inflamação possa formar subgrupos, talvez com comportamentos mais semelhantes, porém o número de casos estudados é pequeno para realizarmos tal abordagem.

Em suma, a soma de um aumento de proliferação hepatocelular nas hepatites crônicas caninas quando comparadas com o fígado normal, a diminuição da expressão de caspase-3, que denota uma diminuição da apoptose celular, e a expressão do gene p53 mutante conferem aos casos de hepatite crônica canina o substrato para uma potencial ocorrência de transformações malignas. Ou seja, dentro daquilo observado neste estudo, as hepatopatias crônicas caninas, mesmo nos graus mais avançados, não devem ser consideradas uma lesão pré-neoplásica, porém apresentam componentes suficientes para desenvolverem mutações gênicas, uma vez que há proliferação com perda da regulação do ciclo celular.

Na comparação entre o grupo de 38 casos de hepatite crônica canina com um fígado normal como padrão de normalidade, e um carcinoma hepatocelular como referencial para biomarcadores, parece claro que a história natural da doença hepática crônica canina envolve alterações que morfológicamente se assemelham em um ponto final. Contudo, numa análise pontual da resposta à estes biomarcadores, ficou evidenciado que as alterações morfológicas não são acompanhadas de alterações moleculares de um modo uniforme dentro do grupo. Possivelmente, a heterogeneidade da resposta aos biomarcadores se deve às suas peculiaridades etiológicas, ao estadiamento da lesão e às idiosincrasias individuais. Rothuizen (2004) descreve as hepatopatias crônicas não como uma doença, mas sim como a manifestação clínica de diferentes etiologias, na qual o fígado se torna cronicamente lesionado, sendo assim não se pode avaliar hepatite crônica

considerando-a uma entidade. Assim, os biomarcadores de prognóstico utilizados neste trabalho (PCNA, caspase-3 e p53) talvez tenham uma resposta mais significativa quando vinculados à etiologia do processo.

O estudo das hepatites crônicas caninas ainda envolve muitos desafios, sobretudo aqueles que dizem respeito à definição da etiologia, patogenia e elementos de diagnóstico viáveis técnica e economicamente, dando possibilidade a um tratamento precoce, preciso e com prognósticos favoráveis. A dificuldade na elucidação da história natural da doença hepática crônica canina reflete a formidável dinâmica de reparação do fígado canino, como adaptação à agressão. Surpreende por mostrar pontos de interseção com as hepatites crônicas em humanos, ao mesmo tempo em que ambas parecem seguir para resultados finais diferentes, mas aponta para um futuro promissor com as pesquisas com biomarcadores. Futuro no qual seja possível entender como, no limiar da agressão hepatocelular, se divorciam os homens e os cães, seguindo caminhos distintos.

6. CONCLUSÕES

- As lesões hepatocelulares avançadas na hepatite crônica e cirrose nos cães, não se configuram como lesões pré-neoplásicas do ponto de vista morfológico.
- Os biomarcadores de proliferação celular, apoptose e expressão de p53 apontam marcante potencial para a ocorrência de transformações malignas no fígado.
- Os animais com hepatite crônica apresentam maior índice proliferativo do que o fígado normal e similar ao carcinoma hepatocelular; índice de apoptose maior do que o carcinoma hepatocelular e menor do que o fígado normal e expressão de p53 intermediária entre o fígado normal e o carcinoma hepatocelular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYOL, G.; DURSUN, A.; POYRAZ, A.; ULUOGLU, Ö.; ATAOGU, Ö.; EDALY, N.; MEMIS, L. p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in non-tumoral liver diseases. **Pathology International.**, v.49, p. 214-221, 1999.

ANDERSSON, M.; SEVELIUS, E. Breed, Sex and age distribution in dogs with chronic liver disease: a demographic study. *Journal of Small Animal Practice.* V.32, p.1-5, 1991.

ANDERSSON, M.; SEVELIUS, E. Circulating autoantibodies in the dogs with chronic liver disease. **Journal of small animal practice**, v.33, p.389-394, 1992.

ANHONY, P.P.; ISHAK, K.G.; NAYAK, N.C.; POULSEN, H.E.; SCHEUER, P.J.; SOBIN, L.H. The morphology of cirrhosis. Reomemendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. **Journal of Clinical Pathology.**, v.31, p.395-414, 1978.

ASSY, N.; GOGN, Y.; ZHANG, M., PETTIGREW, N.M.; PASHNIAK, D.; MINUK, G.Y. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. **Journal of laboratorial clinical medicine**, v.131, n.3, p.251-56, 1998.

BATTS, K.P.; LUDWIG, J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. **American Journal of Surgery Pathology.**, v.19, p.1409-17, 1995

BISHOP, L.; STRNDBERG, J.D.; ADAMS, R.J.; BROWNSTEIN, D.G., PETTERSON, R. Chronic active hepatitis in dogs associated with leptospire. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, p.839-844, 1979.

BOISCLAIR, J.; DORÉ, M.; BEUCHAMP, G.; CHOUINARD, L.; GIRARD, C. Characterization of inflamatory infiltrate in canine chronic hepatitis. **Veterinary Pathology.**, v.38, p.628-635, 2001.

BOOMKENS, S.Y.; SLUMP, E.; EGBERINK, H.F.; ROTHUIZEN, J. PENNING, L.C. PCR screening for candidate etiological agents of canine hepatitis. **Veterinary microbiology**, v.108, p.49-55, 2005.

BOOTHE, D.M.; JENKINS, W.L.; GREEN, R.A.; CORRIER, D.E.; CULLEN, J.M.; BOOTHE, H.W.; WEISE, D. Dimethylnitrosamine-induced hepatotoxicosis in dogs as a model of progressive canine hepatic disease. **American Journal of Veterinary Research.**, v.53, p.411-20, 1992.

CANCHIS, P. W.; GONZALEZ, S.A.; FIEL, M.I.; CHIRIBOGA, L.; YEE, H.; EDLIN, B.R.; JACOBSON, I.M.; TALAL, A.H. Hepatocyte proliferation in chronic hepatitis C: correlation with degree of liver disease and serum α -fetoprotein. **Liver International.**, v.24, p.198-203, 2004.

CENTER, S.A. Pathophysiology and laboratory diagnosis of liver disease. In: ETTINGER, S.J. **Textbook of veterinary internal medicine.** Philadelphia: W.B. Saunders, 1995, v.2, p.1261-321.

CENTER, S.A. Chronic liver disease in the dog: important concepts and management considerations. In: WALTHAM SYMPOSIUM LIVER DISEASE – PRACTICAL PROSPECTIVES, 1996, Birmingham, **Proceedings...** Birmingham: BSAVA, 1996a, p.5-7

CENTER, S.A. Chronic hepatitis, cirrhosis, breed-specific hepatopathies, copper storage hepatopathy, suppurative hepatitis, ranulomatous hepatitis, and idiopathic fibrosis. In: GUILFORD, W.G., CENTER, S.A., STROMBECK, D.R., WILLIAMS, D.A., MEYER, D.J.(Eds). **Strombeck's small animal gastroenterology.** 3.ed Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1996b. p.705-65.

CHOUINARD, L.; MARTINEAU, D.; FORGET, C.; GIRARD, C. Use of polymerase chain reaction and immunohistochemistry for detection of canine adenovirus type 1 in formalin-fixed, paraffin-embedded liver of dogs with chronic hepatitis or cirrhosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.**, v.10, p.320-5, 1998.

CRAWFORD, J.M. The liver and the biliary tract. In: KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. (Eds). **Robbins pathologic basis of disease.** 7.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2005. P.877-938.

CRAWFORD, M.A., SCHALL, W.D., JENSEN, R.K., TASKER, J.B. Chronic active hepatitis in 26 doberman pinschers. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** V.187, p.1343-9, 1985

DARYELL-HART, B.; STEINBERG, S.A., VANWINKLE, T.J., FARNBACH, G.C. Hepatotoxicity of phenobarbital in dogs: 18 cases 1985-1989. **Journal of the American Veterinary Medical Association.**, v.199, p.1060-1066, 1991

DILL-MACKY, E. Chronic hepatitis in dogs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice.**, v.25, p.387-98, 1995.

FARINATI, F.; CARDIN, R.; FIORENTINO, M.; D'ERICO, A.; GRIGIONI, W.; CECCHETTO, A.; NACCARATO, R. Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease. **Journal of Viral Hepatitis.**, v.8, p.34-40, 2001.

FOX, J.G.; DROLET, R.; HIGGINS, R. MESSIER, R.; YAN, L.; COLEMAN, B.E.; PASTER, B.J.; DEWHRIST, F.E. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, p.2479-2482, 1996.

FUENTEALBA, C.; GUEST, S.; HAYWOOD, S.; HORNEY, B. Chronic hepatitis: a retrospective study in 34 dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p.365-73, 1997.

GAYOTTO, L.C.C., ALVES, V.A.F. Marcadores histopatológicos de doenças hepáticas. In: MATTOS, A.A., DANTAS, W. **Compêndio de hepatologia**. São Paulo fundação Byk, 1995, p.57-76.

GINN, P. E., FOX, L. E., BROWER, J. C., GASKIN, A.; I. KURZMAN, D.; KUBILIS, P. S. Immunohistochemical Detection of p53 Tumor-Suppressor Protein is a Poor Indicator of Prognosis for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology** v. 37 p.33-39, 2000.

GOWN, A.M.; WILLINGHAM, M.C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 50, p.449-454, 2002.

HARDY, R.M. Chronic hepatitis: an emerging syndrome in dogs. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice.**, v.15, p.135-50, 1985.

HARDY, R.M.; O'BRIEN, T.ADAMS, L.G. Periportal hepatitis associated with the use of a heartworm-hookworm preventative (diethylcarbamazine-oxibendazole) in thirteen dogs. **Journal of American animal hospital association**, v.25, p.419, 1989.

IDILMAN, R.; DE MARIA, N.; COLANTONI, A.; VAN TIEL, H. Pathogenesis of hepatitis B and C – induced hepatocellular carcinoma. **Journal of Viral Hepatitis**, v.5, p. 285-299, 1998.

ISHAK, K.G. Chronic hepatitis: morphology and nomenclature. **Modern Pathology.**, v.7, p. 690-713, 1994.

JAFFE, M. H.; HOSGOOD G., TAYLOR, H. W., KERWIN, S. C., HEDLUND, C. S., LOPEZ, M. K., DAVIDSON, J. R., MILLER, D. M.; PARANJPE, M. Immunohistochemical and Clinical Evaluation of p53 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology** v. 37. p.40-46, 2000

JARRET, W.F.H.; O'NEIL, B.W. A new transmissible agent causing acute hepatitis, chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. **Veterinary Record**, v.116, p.629-635, 1985

JARRET, W.F.H.; O'NEIL, B.W.; LINDHOLM, I. Persistent hepatitis and chronic fibrosis induced by canine acidophil cell hepatitis virus. **Veterinary Record**, v.120, p.234-235, 1987

JOHNSON, S.E. Disease of the liver. In: ETTINGER, S.J. (Ed). **Textbook of veterinary internal medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. V.2, p.1313-57.

JOHNSON, S.E.; SHERDING, R.G. hepatopatias e doenças do trato biliar. In: BICHARD, S.J. Manual Saunders: clínica de pequenos animais. 1.e.d. São Paulo: Rocca, 1998. p.812-853

JOHNSON, S.E; ZAWIE,D.A.; GILBERTSON, S.R.; STERNLIEB, I. Chronic active hepatitis in Doberman pinscher. **Journal of the American Veterinary Medical association.**, v.180, p.1438-42, 1982.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. São Paulo: Guanabara koogan, 2004, p.540

KOUKOUILIS, G.; RAYNER, A.; TAN, K.; WILLIAMS, R.; PORTMANN, B. Immunolocalization of regenerating cells after submassive liver necrosis using PCNA stainig. **The journal of Pathology**, v.166, p.359-68, 2005.

KRONENBERGER, B.; RÜSTER, B.; LEE, J.H.; SARAZIN, C.; ROTH, W.K.; HERRMANN, G.; ZEUZEM, S. Hepatocellular proliferation in patients with chronic hepatitis C and persistently or abnormal aminotransferase levels. **Journal of Hepatology**, v. 33, p. 640-647, 2000.

LEE C.H.; KWEO, O.K. Mutations of p53 Tumor Suppressor Gene in Spontaneous Canine Mammary Tumors. **Journal of Veterinary Science**. v.3, p.321-325, 2004

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J. **Liver tumors in cats and dogs. Compendium**, January, 2004.

LITTLE, C.J.L.; MACNEIL, P.E.; ROBB, J. Hepatopathy and dermatitis in a dog associated with the ingestion of mycotoxins. **Journal of Small animal Practice**, v.32, p.23-26, 1991.

LOGUERCIO, C.; CUOMO, A.; TUCCILLO, C.; GAZZERRO, P.; CIOFFI, M.; MOLINARI, A.M.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Liver p53 expression in pacientes with HCV-related chronic hepatis. **Journal of Viral Hepatitis**. V.10, p.266-70, 2003.

LOUKOPOULOS, P.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Clinical and Pathologic Relevance of p53 Index in Canine Osseous Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p.237-248, 2003.

LUDWIG, J. Histopathological diagnosis and terminology of chronic hepatitis. **Journal of hepatothology**, v.23, suppl.1, p.49-53, 1995.

MADEWELL, B.R. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.15, p.334-340, 2001.

MAGGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v. 116, p.3051-60, 2003.

MAGAMI, Y.; AZUMA, T. INOKUSHI, H.; KOKUNO, S.; MORIYASU, F.; HATTORI, T. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile ducts in adult mouse liver. **Liver**, v. 22, p.419-25, 2002

MÜLLAUER, L.; GRUBER, P.; SEBINGER, D., BUCH, J., WOHLFART, S., CHOTT, A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. **Mutation Research**, v.488, p.211-31, 2000.

PATEL, T. Apoptosis in hepatic pathophysiology. **Clinics in liver disease**. V.4 p.295-371, 2000.

PATNAIK, A.K; HURVITZ A.I.; LIEBERMAN, P.H. Canine hepatic neoplasm: a clinicopathological study. **Veterinary pathology** v.17, p.553-564, 1980

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CATAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v., p. 237-46, 1997

PITOT, H.C. Pathways of progression in hepatocarcinogenesis. **Lancet**, v.358, p.859-60, 2001

POLAT, A.; KAYASELCUK, F.; EGILMEZ, R.; TUNCER, I. Expression of FAS antigen and Bcl-2 protein in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. **Turkish journal of Medical Scienc.**, v.31 p.517-521, 2001.

PORTER, A.G.; JÄNICKE, R.U. emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.6, 99-104, 1999

RAKISH, P.M.; PRASSE, K.W., LUKERT, P.D., CORNELIUS, L.M. immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. **Veterinary Pathology**, v.23, p.478-484, 1986.

RALLIS, T.; DAY, M.J.; SARIDOMICHALAKIS, M.N.; ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A.F. Chronic Hepatitis associated with leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. **Journal of comparative pathology**, v.132, p.145-152, 2005

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A.; JOHNSON, G.C. Immunohistochemical characterization of canine hyperplastic hepatic lesions and hepatocellular and biliary neoplasm with monoclonal antibody hepatocyte paraffin 1 and monoclonal antibody to cytokeratin 7. **Veterinary Pathology**., v.38, p. 636-43, 2001.

ROTH, L. Hepatic pathophysiology and biopsy interpretation. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**., v.2. p.296-301, 1987.

ROTHUIZEN, J. Current Concepts of Chronic Hepatitis in Dogs. **The European Journal of Comparative Gastroenterology**, v.2, p.15-20, 1997.

ROTHUIZEN, J. Canine chronic liver disease: where are we now? Four pointers for future research. **The Veterinary Journal**, v.167. p.219, 2004.

RUBIN, E.; FARBER J.L. The liver and biliary system In: RUBIN, E.; FARBER J.L. **Pathology**. 2ed., Philadelphia: lippincott company, 1998. P.704-785.

SAFTOU, A.; CIUREA, T.; GEORGESCU, C.; BANITA, M.; COMANESCU, V.; ROGOVEANU, I.; GORUNESCU, F. GEORGESU, I. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. **Journal of cellular molecular medicine**. v. 07, n. 4, p.436-446, 2003.

SARLI, G.; BENAZZI, C.; PREZIOSI, R.; MARCATO, P.S. Assessment of proliferative activity by anti-PCNA monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded samples and correlation with mitotic index. **Veterinary Pathology**, v.32, p.93-96, 1995.

SARLI, G. Chronic active hepatitis in dogs. **Veterinaria**, v.6, p. 66-73, 1992

SCHAFER, K.A. The cell cycle: A review. **Veterinary Pathology**., v.35, p.461-478, 1998.

SCHEUER, P.J.; STANDISH, R.A., DHILLON, A.P. Scoring of chronic hepatitis. **Clinical liver disease**., v.6, 2002

SCHUMAN, M.; GALLE, R. Apoptosis in liver disease. **European journal of Gastroenterology and Hepatology**. V. 13, 785-90, 2001.

SEVELIUS, E.; ANDERSSON, M.; JÖNSSON, L. Hepatic accumulation of alpha-1-antitrypsin in chronic liver disease in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, V.111, p.401-12, 1994

SEVELIUS, E. Diagnosis and prognosis of chronic hepatitis and cirrhosis in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p.521-28, 1995.

SHEN, L.J.; ZHANG, H.X.; ZHANG, Z.J.; LI, J.Y.; CHEN, W.Q.; YANG, W.B.; HUANG, R. Detection of HBV, PCNA and GST- π in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, p. 459-62, 2003.

SPEETI, M.; ERIKSSON, J.; SAARI, S.; WESTERMARCK, E. Lesions of subclinical doberman hepatitis. **Veterinary Pathology**, v.35, p.361-9, 1998.

STERCZER, À.; GAÁL, T.; PERGE, E.; ROTHUIZEN, J. Chronic hepatitis in the dog. A review. **Veterinary Quaterly**, v.23, p.148-52, 2001.

STROMBECK, D.R.; GRINBBLE, D. Chronic Active hepatitis in the dog. **JAVMA**, v.4, p.380, 1978.

STROMBECK, D.R.; GUILFORD, W.G. Chronic liver disease. In: STROMBECK, D.R.; CENTER, S.A.; GUILFORD, W.G.; WILLIAMS, D.A.; MEYER, D.J. **Strombeck's Small animal gastroenterology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.705-765

STROMBECK, D.R.; MILLER, L.M.; HARROLD, D. Effects of corticosteroid treatment on survival time in dogs with chronic hepatitis: 151 cases (1977-1985). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.193, p.1109-13, 1988.

STROMBECK, D.R.; ROGERS, W., GRIBBLE, D. Chronic active hepatic disease in a dog. – *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 168, p.802-04, 1976

TANNAPFEL, A.; GEISSLER, F.; KÖCKERLING, F.; KATALINIC, A.; HAUSS, J. WITTENKIND, C. Apoptosis and proliferation in relation to histopathological variables and prognosis in hepatocellular carcinoma. **Journal of Pathology**, v.187, p.439-45, 1999.

THOMAS, D.A.; SIMPSON, J.W.; HALL, J. **BSAVA Manual of canine and feline gastroenterology**. Ames: Iowa university State Press, 1996.

THORNBURG, L.P. Chronic active hepatitis – what is it and does it occur in dogs? **Journal of American animal hospital association**. V.18, p.21-2, 1982.

THORNBURG, L.P. Postnecrotic canine cirrhosis – 6, suspected causes. **Veterinary medicine small animal clinics**, V.78, p.886-92, 1983.

THORNBURG, L.P. A study of canine hepatobiliary disease, part 3: hepatitis e cirrhosis. **Companion Animal Practice**, v.2, p. 17-20, 1988.

THORNBURG, L.P.; ROTTINGHAUS, G.; DENNIS, G.; CRAWFORD, S. The relationship between hepatic copper content and morphologic changes in the liver of West Highland White Terriers. **Veterinary Pathology**., v.33, p.656-61, 1996.

TOSTES, R.A. Comparação entre o diagnóstico histológico por biopsia cortante e aspirativa, exame citológico e diagnóstico post-mortem de hepatopatias em cães. Botucatu, 1998, 259p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP.

TOSTES, R.A. Avaliação histológica da fibrose na doença hepática crônica canina: análise semiquantitativa por escores, análise digital morfométrica e detecção imunoistoquímica de adenovírus canino tipo 1 (CAV-1). Botucatu, 2003, 100p. Tese de doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP.

TOSTES, R.A.; BANDARRA, E.P. Aspectos etiológicos, epidemiológicos e patológicos das hepatites crônicas em cães. **MedveP- Revista científica de Medicina veterinária**. v. 2. p. 67-72, 2004.

TSUKAMOTO, H.; MATSUOKA, M.; FRENCH, S.W. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. **Seminars on liver disease**., v.10, p.56-65, 1990.

TWEDT, D.C. Cirrhosis: a consequence of chronic liver disease. **Veterinary Clinics of North America Small animal Practice**.v.15, p.151-76, 1985.

VATNE, M. **Glycoproteins and chronic liver disease in the dog. Biochemical, immunohistochemical and ultrastructural studies**. Upsala: Swedish University of Agricultural /sciences, 2002. 58p. Doctoral thesis

WATSON, P.J. Chronic hepatitis in dogs: a review of current understanding of etiology, progression, and treatment. **The Veterinary Journal**, v.167. p.228-241, 2004.

ZÖRNIG, M.; HUEBER, A.O.; BAUN, W.; EVAN, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochemica et Biophysica Acta**., v. 1551, p.F1-F37, 2001.