

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

**PADRÃO HISTOPATOLÓGICO, PERFIL  
IMUNOISTOQUÍMICO E POTENCIAL PRÉ-MALIGNO DAS  
LESÕES DISPLÁSICAS DA PRÓSTATA CANINA**

**GIOVANA WINGETER DI SANTIS**

**BOTUCATU – SP**

**Mai 2007**

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

**PADRÃO HISTOPATOLÓGICO, PERFIL  
IMUNOISTOQUÍMICO E POTENCIAL PRÉ-MALIGNO DAS  
LESÕES DISPLÁSICAS DA PRÓSTATA CANINA**

**GIOVANA WINGETER DI SANTIS**

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

**Orientador: Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra  
Co-Orientador: Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado**

**BOTUCATU – SP**

**Mai 2007**

**Banca examinadora:**

---

Prof. Dr. Enio Pedone Bandarra

---

Prof<sup>ª</sup>. Ass. Dra. Renée Laufer Amorim

---

Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli

Botucatu, 03 de maio de 2007

“Se não há nada que brilhe debaixo da pálpebra, é que nada há que pense no cérebro, e nada há que ame no coração”.

Victor Hugo

Aos meus pais Neusa e José Francisco:

Dedico a vocês este trabalho,  
vocês são o alicerce da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Enio Pedone Bandarra: Você sempre tornou meu caminho mais suave, foi o *Big Boss* em todas as situações que o exigiam, foi paciente e carinhoso nos momentos difíceis. Você é um grande mestre, um grande amigo, e o grande responsável pela minha formação acadêmica. Muito obrigada por tudo.

À Professora Renée Laufer Amorim: pela participação imprescindível em todos os momentos, pela paciência, dedicação, amizade, sensibilidade, honestidade, entusiasmo... Impossível listar, conviver com você é um aprendizado constante, sobretudo quanto à vida. Na sua aparente fragilidade, faz valer a força da leonina.

Aos meus pais José Francisco e Neusa e a minha irmã Vanessa: Vocês permitiram que este trabalho se concretizasse, apoiaram-me incondicionalmente mesmo quando minhas escolhas não foram as mais acertadas, seguraram as quedas, exaltaram as vitórias, participaram de cada momento integralmente. Vocês são insuperáveis!

À Denise Aparecida Fioravanti Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e José Roberto Lalla Júnior da Seção de Pós-Graduação da FMVZ – UNESP – Botucatu, pela atenção, paciência, carinho e simpatia durante todo nosso convívio. À Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da FMVZ – UNESP – Botucatu, pela compreensão e disposição na resolução de problemas.

À amiga Veridiana M. B. D. de Moura: você abriu a primeira porta e isso jamais será esquecido. Desde então fortalecemos nossa amizade e passamos a compor uma equipe “loira” que deu certo. Aprendemos tanto, crescemos tanto... Você foi fundamental na realização de mais este trabalho, muito obrigada por tudo.

Ao amigo Paulo Felipe, não apenas pela valiosa colaboração nas análises estatísticas, mas por tudo que vivemos neste período.

Ao Prof. Luiz Henrique de Araújo Machado, meu co-orientador, por ter confiado e abraçado a causa, por ser o mais novo próstático.

À amiga igualmente próstática Marcela Marcondes Pinto Rodrigues: Você foi minha base emocional em um dos períodos mais complicados, trouxe ao meu convívio pessoas maravilhosas e me ajudou a seguir um novo rumo. Obrigada por ser especial na minha vida.

Ao meu querido João Carlos Pinheiro Ferreira por ser um grande companheiro, por dar chão e permitir voar, pela alegria, pelo carinho, pela serenidade, pela amizade, pela paciência... Por me trazer paz emocional para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos amigos de Londrina, especialmente ao Prof. Antonio Carlos, Prof<sup>a</sup> Ana Paula, Cláudia, Kleber, Ludmila, Letícia e Tiziane: sou grata pela compreensão, amizade e carinho. Vocês sempre estarão no meu coração.

Aos amigos Alfredo, Priscila, Julio, Caio, Leandro, Carminha, Jota, Rafael, Pedro, Giuliana, Rômulo, Celmira e Helder, pelas longas

conversas, pela companhia, pelo carinho, pelas festas, pela alegria. É muito bom tê-los...

Ao Prof. João Lauro Vieira pelo auxílio na leitura das lâminas nos diagnósticos de HGPI e ensinamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao amigo Maury Raul, por estar sempre pronto a ajudar e por tornar mais alegres nossos dias na patologia.

À todos da Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu que tornaram o ambiente mais agradável e prazeroso em todo o período em que lá estive.

Aos amigos da UNIFEOB, especialmente aos professores Helder, Marcão, Cristiano, Priscila e João Flávio, ao residente Geraldo e aos monitores, Márcio, Luciana, Simone, Rafael, Carol e Rodrigo. Foi muito bom conviver com todos vocês!

Aos Professores Laura Maria A. de Figueiredo, Noeme Souza Rocha e Julio Lopes Sequeira, pela participação em minha formação profissional.

A todos aqueles que fizeram ou fazem parte de minha vida e que certamente, de alguma forma, colaboraram para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada a todos!!!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Aspectos morfológicos, fisiológicos e patológicos.....	4
2.2. Neoplasia intra-epitelial prostática (PIN).....	9
2.3. Inflamação da próstata e atrofia inflamatória proliferativa (PIA) .....	18
2.4. Bases moleculares da carcinogênese e biomarcadores com valor prognóstico em lesões prostáticas .....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
3.1. Local da pesquisa e material utilizado.....	36
3.2. Preparo e avaliação das lâminas .....	37
3.3. Padronização da técnica de imunistoquímica.....	38
3.3.1. Roteiro usado na aplicação da técnica.....	39
3.3.2. Amostras utilizadas na padronização dos anticorpos em tecido canino .....	42
3.4. Avaliação imunistoquímica .....	43
3.5. Coloração de AgNOR.....	45
3.6. Análise morfométrica.....	46
3.7. Análises estatísticas.....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
4.1. Aspectos gerais dos casos de HGPIN e PIA.....	50
4.2. Avaliação imunistoquímica e de AgNOR.....	57
4.3. Análise morfométrica.....	81
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
5.1. Aspectos gerais dos casos de HGPIN e PIA.....	84
5.2. Avaliação imunistoquímica e de AgNOR.....	86
5.3. Análise morfométrica.....	93
5.4. Comentários finais.....	94
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>97</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>98</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>115</b>

**DI SANTIS, G.W. Padrão histopatológico, perfil imunoistoquímico e potencial pré-maligno das lesões displásicas da próstata canina. Botucatu, 2007, 124p., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

## **RESUMO**

A neoplasia intra-epitelial prostática (HGPI) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) são lesões potencialmente pré-malignas encontradas na próstata humana (De Marzo et al., 1999; Bostwick e Qian, 2004). HGPI tem sido relatada na próstata canina com características semelhantes às observadas em humanos (Waters et al., 1997), porém a PIA ainda não foi caracterizada nesta espécie. O presente trabalho objetivou a avaliação imunoistoquímica do índice proliferativo (PCNA e Ki-67), da expressão de proteínas pró-apoptose (caspase-3), genes supressores de tumores (p-53), genes inibidores de apoptose (bcl-2) e de moléculas de adesão (E-caderina), além da avaliação histoquímica do estado proliferativo (AgNOR) e da determinação de mensurações nucleares por análise quantitativa computadorizada de imagens (AQCI) em focos HGPI, PIA e em ácinos normais da próstata canina. Considerando os resultados de ácinos normais, constatou-se que as lesões estudadas apresentam alto índice proliferativo; capacidade proliferativa no compartimento epitelial secretor; ausência de expressão de p-53; perda de expressão de E-caderina; padrão de AgNOR semelhante ao de ácinos normais; e núcleos celulares maiores e com fator de circunferência maior. Focos de PIA exibem ainda índice apoptótico semelhante ao de ácinos normais e predomínio do linfócitos T, quando considerado o infiltrado linfocítico. Tais achados aproximam estas duas lesões entre si e sugerem que possam estar envolvidas no processo de transformação neoplásica da próstata canina.

**DI SANTIS, G.W. Histopathological patterns, immunohistochemical profile and premalignant potential of dysplastic canine prostate lesions. Botucatu, 2007, 124p., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

### **ABSTRACT**

Prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and proliferative inflammatory atrophy (PIA) are potentially premalignant lesions, found in human prostate (De Marzo et al., 1999; Bostwick e Qian, 2004). HGPIN have been reported in canine prostate (Waters et al., 1997), and share the same aspects with the humans, and PIA hadn't been described in the dogs. The aim of this work was to evaluate, by immunohistochemistry proliferative index (PCNA and KI-67), proapoptotic proteins expression (caspase 3), tumour suppressor gene (p-53), adhesion molecules (E-cadherin), histochemical proliferative status (AgNOR) and nuclear measurement by image computer quantitative analysis (AQCI) in HGPIN focus, PIA e normal acinus in canine prostate. Comparing the normal acinus results, the lesions showed higher proliferative index, secretory epithelial cells capable of proliferation, absence of p-53 expression, loss of E-cadherin expression, AgNOR patterns similar to normal acinus, cellular nucleus bigger and with higher nuclear round factor. PIA had the same apoptotic index as the normal acinus and mainly T lymphocytes in the inflammatory infiltrate. Our findings allow us to consider these two lesions close to each other, and they may be involved in the process of neoplastic transformation of canine prostate.

## 1) INTRODUÇÃO

A próstata canina tem sido tema de diversos estudos nas últimas décadas, o que não se justifica apenas pela grande incidência de afecções que a acometem, mas também às similaridades com a glândula humana, principalmente no que concerne à hiperplasia prostática benigna (HPB) e ao câncer prostático (Lowseth et al., 1990; Waters et al., 1998; De Marzo et al., 1999a).

Em 1986, McNeal e Bostwick (1986) propuseram que a displasia intraductal na próstata humana poderia representar uma lesão pré-maligna. Desta forma, tal possibilidade incitou a realização de contínuos estudos a respeito, cujos resultados vêm fundamentando o aspecto pré-canceroso desta lesão (Bostwick e Brawer, 1987; Bostwick, 1995; Feneley e Busch, 1997; De Marzo et al., 2003; Bostwick e Qian, 2004; Joniau et al., 2005), atualmente denominada neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) (Bostwick e Brawer, 1987), e que a depender de características citológicas é classificada em baixo (LGPIN) ou alto grau (HGPIN), sendo apenas a última potencialmente pré-maligna (Drago et al., 1989).

Outras lesões consideradas possivelmente pré-malignas também têm sido continuamente avaliadas quanto a esse potencial, entre elas a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (De Marzo et al., 1999b; De Marzo et al., 2003; Van Leenders et al., 2003; Platz e De Marzo, 2004; Faith et al., 2005; De Marzo et al., 2006; Tomas et al., 2007).

A despeito da importância da determinação do comportamento biológico destas lesões no cão, poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura referindo HGPIN em cães (Waters et al., 1997; Waters e Bostwick, 1997a; Waters e Bostwick, 1997b; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998; Medewell et al., 2004; Rossignol et al., 2004), embora a lesão já seja mencionada em artigos de revisão (Johnston et al., 2000; Paclikova et al., 2006).

Quanto à PIA, até o presente momento, em apenas um trabalho foram descritos casos de atrofia inflamatória da próstata canina buscando avaliar seu papel na evolução do câncer prostático (Rodrigues, 2007), ainda que prostatites sejam comumente referidas (Cowan et al., 1991; Bell et al., 1991; Krawic, 1994; Johnston et al., 2000; Paclikova et al., 2006).

Em trabalhos anteriores, constatou-se um grande número de próstatas caninas que apresentavam inflamação, aguda ou crônica, em associação com atipias epiteliais, denominadas genericamente de displasias, acompanhadas de atrofia glandular focal (Laufer Amorim, 2001; Di Santis, 2003; De Moura, 2004).

Diante disso, destaca-se a importância da avaliação do comportamento biológico de tais lesões na próstata do cão, tanto no intuito de ampliar o conhecimento atual em carcinogênese prostática na própria espécie, quanto para fornecer subsídios para a utilização do cão como modelo no entendimento da carcinogênese prostática humana, ou mesmo no desenvolvimento de alternativas terapêuticas que inibam o

desenvolvimento ou induzam a regressão de tais lesões antes do estabelecimento de câncer invasivo tanto no cão quanto no homem.

Desta forma, o presente trabalho objetivou:

⇒ Avaliar o padrão histopatológico das lesões displásicas em próstatas caninas, visando selecionar aquelas que apresentavam critérios morfológicos diagnósticos de neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau (HGPIIN) ou de atrofia inflamatória proliferativa (PIA);

⇒ Determinar o imunofenótipo dos linfócitos presentes no infiltrado inflamatório adjacente aos focos de PIA;

⇒ Estabelecer um perfil de normalidade do tecido prostático canino para biomarcadores\* com valor prognóstico;

⇒ Utilizar os mesmos biomarcadores\* nos focos de PIA e HGPIIN caninos;

⇒ Comparar os resultados obtidos para os biomarcadores\* nos focos de PIA e HGPIIN com aqueles dos ácinos normais.

\* Avaliação imunoistoquímica do índice proliferativo com PCNA e Ki-67, do índice apoptótico com caspase 3, e da expressão de bcl-2, p-53 e E-caderina; avaliação da proliferação celular pela marcação histoquímica com AgNOR e mensuração de área, perímetro e do fator de circunferência nuclear por análise quantitativa computadorizada de imagens (AQCI).

## **2) REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1) Aspectos morfológicos, fisiológicos e patológicos**

A próstata é a única glândula sexual acessória do cão e tem como principal função a produção do fluido prostático, que fornece o ambiente propício para a sobrevivência e motilidade dos espermatozóides (Dorfman e Barsanti, 1995). Além disso, participa do controle do fluxo urinário da bexiga, devido ao volume de musculatura lisa; como glândula exócrina acrescenta no plasma seminal moléculas e enzimas como fibrinolisa e coagulase; e como glândula endócrina auxilia no rápido metabolismo da testosterona em diidrotestosterona (Kumar e Majumder, 1995).

Apresenta-se ventral ao reto e dorsal à sínfise pélvica ou à parede abdominal ventral e envolve completamente a uretra proximal, sendo dividida em dois lobos por um septo medial de tecido fibroso (Johnston et al., 2001) (Figura 1).

Histologicamente, a próstata canina é dividida em lóbulos constituídos por glândulas túbulo-alveolares compostas, originadas no ducto uretral, sustentados pelo estroma e envoltos por uma espessa cápsula fibromuscular (Johnston et al., 2001). As células glandulares são cúbicas a colunares e apresentam-se normalmente em dupla camada; epitélio secretor e epitélio basal, este último localizado ao longo da membrana basal. O estroma consiste de fibroblastos e células musculares lisas, envolvidos em colágeno, com vasos sanguíneos e nervos (Barsanti e Finco, 1992; Dorfman e Barsanti, 1995) (Figura 2).

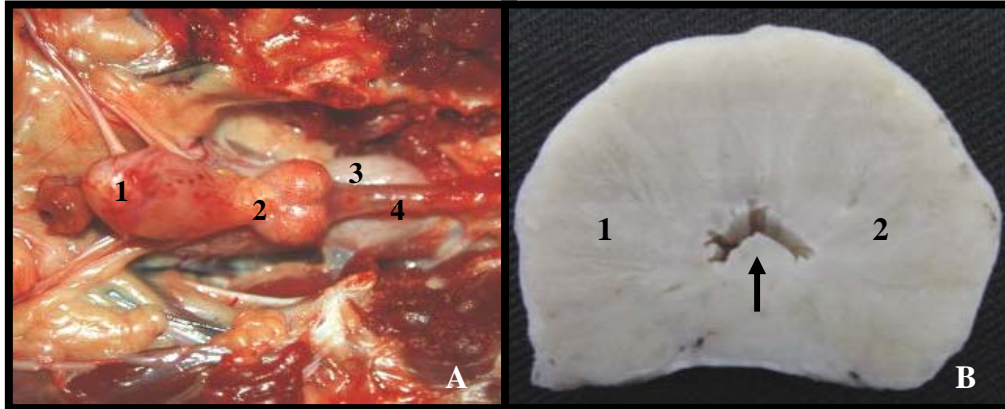


Figura 1: A) Cavidade pélvica canina (retiradas as estruturas ósseas) vista ventro-dorsal. Observam-se bexiga urinária (1); próstata (2); reto (3) e uretra (4). B) Corte transversal de uma próstata canina. Lobo esquerdo (1), lobo direito (2) e uretra prostática (seta) (Di Santis, 2003).

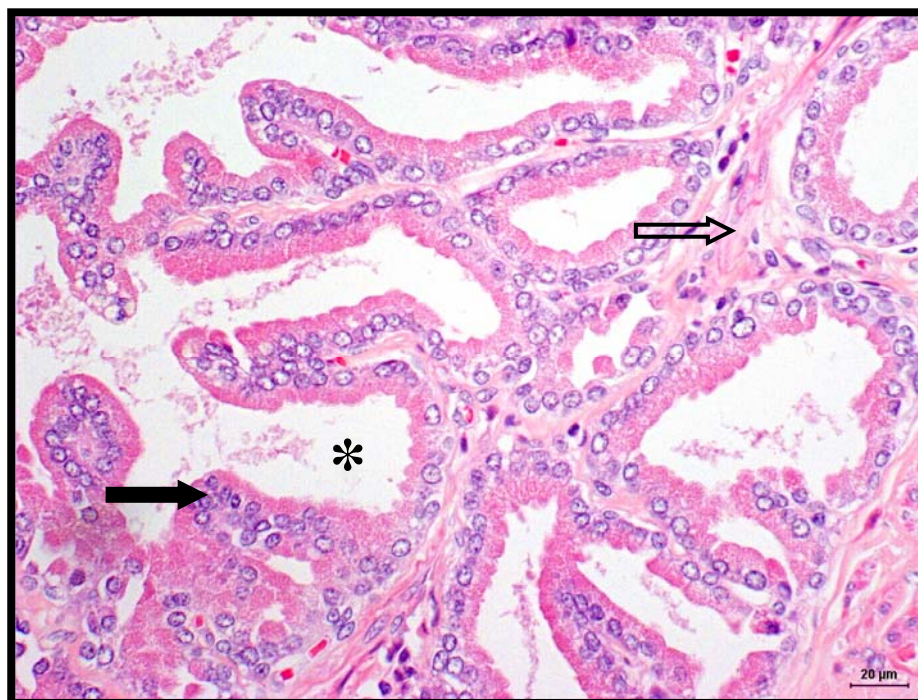


Figura 2: Próstata canina normal. Observam-se epitélio secretor (seta preenchida), lúmen glandular (asterisco) e estroma fibromuscular (seta vazada). Hematoxilina e Eosina.

No homem, a camada de células basais é contínua e a interrupção desta estrutura está envolvida na carcinogênese prostática (Epstein, 1997; Helpap, 1998). Por outro lado, em cães adultos, apenas os ductos são revestidos por camada contínua de células basais (Leav et al., 2001), enquanto nos ácinos são descontínuas (Leav et al., 2001; Di Santis, 2003).

A exposição da glândula a hormônios androgênicos durante a vida do animal, causa aumento gradual tanto em seu componente epitelial quanto estromal, enquanto a castração leva à atrofia do órgão (Johnston et al., 2001).

Doenças prostáticas são comuns em cães adultos e idosos, sendo as mais freqüentes: hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatites, cistos, adenocarcinomas e abscessos (Krawiec, 1994). A HPB é a mais comum e está associada, tanto nesta espécie, quanto no homem, ao avanço da idade e a desequilíbrios hormonais envolvendo a testosterona, diidrotestosterona (DHT) e o estrogênio (Lowseth et al., 1990; Barsanti, 1999).

O adenocarcinoma prostático canino acomete animais entre oito e dez anos de idade. É uma doença insidiosa, altamente agressiva, que determina metástases em cerca de 80% dos casos. Os linfonodos pélvicos, pulmões e o sistema esquelético são os locais mais comuns de disseminação desta neoplasia (Kozlowski, 1999; Cornel et al., 2000).

As similaridades entre o câncer prostático humano e canino vêm sendo observadas há muitas décadas (Leav e Ling, 1968), entre elas: desenvolvimento influenciado pela idade (Leav e Ling, 1968; Bell et al., 1991; Waters et al., 1998; Cornell et al., 2000); freqüente coexistência de lesões pré-malignas; a possibilidade da neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau ser uma fase intermediária entre o epitélio benigno e o carcinoma (Waters et al., 1997; Waters e Bostwick, 1997a; Waters e Bostwick, 1997b; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998); o alto grau de malignidade e a heterogenicidade morfológica e fenotípica (Waters et al., 1998; Cornell et al., 2000) a aparente independência a andrógenos no estágio final da doença (Bell et al., 1991; Waters et al., 1998; Teske et al., 2002); e a semelhante distribuição anatômica e a natureza das metástases (Leav e Ling, 1968; Bell et al., 1991; Waters et al., 1998; Cornell et al., 2000).

Quanto à idade de ocorrência de câncer prostático no homem e no cão, Waters et al. (1996) criaram um algoritmo para converter a idade cronológica de cães de diferentes portes e raças em idade fisiológica expressa em anos humanos e compararam a idade dos indivíduos no momento do diagnóstico de câncer prostático entre 686 cães e 110 homens. A média de idade fisiológica de cães foi de 67 anos, enquanto em humanos foi de 70 anos, reforçando a idéia de que o cão é um importante modelo no estudo da carcinogênese prostática.

O câncer prostático e a HPB apresentam eventos similares em sua patogenia, entretanto é improvável que a HPB seja caracterizada como uma lesão pré-neoplásica (De Marzo et al., 1999a), embora frequentemente ocorra em concomitância a lesões potencialmente pré-malignas (HGPIIN, PIA e hiperplasia adenomatosa atípica) ou a carcinomas incidentais em próstatas humanas (Sciarra et al., 2002; Di Silverino et al., 2003).

No homem acredita-se que a fase inicial do adenocarcinoma da próstata corresponda à HGPIIN (McNeal e Bostwick, 1986; Bostwick e Brawer, 1987; Bostwick, 1995; Feneley e Busch, 1997; De Marzo et al., 2003a; Bostwick e Qian, 2004; Joniau et al., 2005). Tal lesão foi encontrada em 82% das próstatas com carcinoma invasivo e em 43% das glândulas de homens acima de cinquenta anos, sem sinais de neoplasia (McNeal e Bostwick, 1986).

Outras lesões consideradas possivelmente pré-malignas, seja por similaridades morfológicas com o carcinoma prostático ou por envolverem fatores potencialmente carcinogênicos, também têm sido avaliadas quanto a esse potencial, sendo as principais: hiperplasia adenomatosa atípica (Atypical Adenomatous Hyperplasia - AAH) (Kovi e Mostofi, 1989; Feneley e Busch, 1007; Helpap, 1998; Haussler et al., 1999) e atrofia inflamatória proliferativa (Proliferative Inflammatory Atrophy - PIA) (De Marzo et al., 1999b; De Marzo et al., 2003b; Van Leenders et al., 2003;

Platz e De Marzo, 2004; Faith et al., 2005; De Marzo et al., 2006; Tomas et al., 2007).

Ainda, em biopsias de tecido humano, atipias epiteliais suspeitas, mas não diagnósticas para malignidade, denominadas genericamente “proliferações atípicas de pequenos ácinos (Atypical Small Acinar Proliferation - ASAP)”, são comumente alvo de estudos pela forte correlação com carcinoma prostático em biopsias subseqüentes (Dundor, 1998; Helpap, 1998; Moore et al., 2005; Schlesinger et al., 2005).

É importante destacar que ASAP não é considerada uma afecção específica, mas uma categoria diagnóstica válida (Dundor, 1998). A dificuldade no diagnóstico de câncer em geral é resultante de amostras pequenas, com número de ácinos reduzido, de alterações histológicas provenientes de artefatos de técnica, ou da concomitância com inflamação (Schlesinger et al., 2005).

## **2.2) Neoplasia intra-epitelial prostática (PIN)**

Pré-câncer ou neoplasia intra-epitelial (IEN) é uma lesão não invasiva que apresenta anormalidades genéticas e perda das funções de controle celular, além de algumas características fenotípicas de câncer. Em humanos há relatos deste tipo de alteração em órgãos como cólon, cérvix, pulmão, pele, glândula mamária, bexiga urinária e próstata (O’Shaughnessy et al., 2002).

Conceitualmente displasia significa “uma lesão na qual parte da espessura de um epitélio é substituída por células com vários graus de atipia”, e representa “uma reação do epitélio a uma injúria” (Mattos, 1999).

O termo displasia foi utilizado inicialmente para designar uma variedade de alterações não usuais em glândulas ou no epitélio glandular para diferenciá-las de lesões inquestionavelmente benignas e de proliferações verdadeiramente malignas, e abrangia uma série de alterações, como as de natureza atrófica, inflamatória e metaplásica, além de hiperplasias atípicas glandulares e intraductais (Kastendieck et al., 1976 *apud* Kastendieck e Helpap, 1989).

Em 1986, McNeal e Bostwick (1986) propuseram que a displasia intraductal na próstata humana poderia representar uma lesão pré-maligna, constituindo-se no precursor biológico direto do carcinoma prostático, assim como definiram os critérios morfológicos estritos para o diagnóstico e classificação das lesões em três graus, a depender da severidade das atipias observadas. Desta forma, tal possibilidade incitou a realização de contínuos estudos a respeito, cujos resultados vêm fundamentando o aspecto pré-canceroso desta lesão (Bostwick e Brawer, 1987; Bostwick, 1995; Feneley e Busch, 1997; De Marzo et al., 2003a; Bostwick e Qian, 2004; Joniau et al., 2005).

Por tratar-se de uma alteração com características histopatológicas e comportamento biológico específicos, Bostwick e Brawer (1987) propuseram a utilização do termo neoplasia intra-epitelial prostática (PIN),

seguindo os mesmos critérios morfológicos utilizados para o diagnóstico e classificação das lesões em três graus (Quadro 1).

**Quadro 1: Critérios para classificação da neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) segundo Bostwick e Brawer (1987).**

	<u>Características</u> <u>Arquiteturais</u>	<u>CARACTERÍSTICAS</u> <u>CITOLÓGICAS</u>			<u>CARACTERÍSTICAS</u> <u>ASSOCIADAS</u>	
	<sup>1</sup> CA	Núcleo	Cromatina	Nucléolo	<sup>2</sup> CB	<sup>3</sup> MB
<b>PIN 1</b>	Células epiteliais agrupadas, estratificação e espaçamento irregular.	Aumentado, com marcada variação no tamanho.	Normal	Infreqüente	Intacta	Intacta
<b>PIN 2</b>	Similar ao PIN 1. Apresenta maior agrupamento e estratificação.	Aumentado: com alguma variação no tamanho.	Aumentada	Ocasionalmente grande e proeminente	Intacta	Intacta
<b>PIN 3</b>	Similar ao PIN 2: pontes luminiais ocasionais.	Marcadamente aumentado: com alguma variação no tamanho	Marcadamente e aumentada	Freqüente, grande: similar ao carcinoma invasivo.	Pode mostrar alguma falha	Pode mostrar alguma falha

<sup>1</sup> Características arquiteturais; <sup>2</sup> Camada de células basais; <sup>3</sup> Membrana basal

O termo foi endossado em 1989, situação onde se estabeleceu também que, a depender das características citológicas, a PIN seria classificada em baixo (LGPIN) ou alto grau (HGPIN) (Drago et al., 1989), sendo apenas a última considerada potencialmente pré-maligna (Bostwick, 1995; Billis, 2003).

Algumas modificações quanto aos critérios para diagnóstico e classificação de PIN foram realizadas (Quadro 2), uma delas bastante significativa na diferenciação destas lesões com carcinoma prostático: a

manutenção da membrana basal intacta, mesmo nos casos de HGPIN, (Bostwick, 1995; Bostwick et al., 1995).

**Quadro 2: Critérios para classificação da neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) segundo Bostwick (1995).**

<b>Características</b>	<b>PIN de baixo grau (LGPIN) (Anteriormente PIN 1)</b>	<b>PIN de alto grau (HGPIN) (Anteriormente PIN 2 e 3)</b>
<b>Arquitetura</b>	<i>Células epiteliais agrupadas e estratificação com espaçamento irregular</i>	<i>Similar ao PIN de baixo grau: Maior agrupamento e estratificação celular. Quatro formas: sólido, micropapilar, cribriforme e plano.</i>
<b>Citologia</b>		
<b>Núcleo</b>	<i>Aumentado com marcante variação no tamanho</i>	<i>Aumentado: com alguma variação em tamanho e forma</i>
<b>Cromatina</b>	<i>Normal</i>	<i>Densidade aumentada e condensação</i>
<b>Nucléolo</b>	<i>Raramente proeminente</i>	<i>Ocasionalmente a freqüentemente grande e proeminente, similar ao carcinoma invasivo; algumas vezes múltiplo</i>
<sup>1</sup> <b>CB</b>	<i>Intacta</i>	<i>Pode mostrar algum rompimento</i>
<sup>2</sup> <b>*MB</b>	<i>Intacta</i>	<i>Intacta</i>

<sup>1</sup> *Camada de células basais;* <sup>2</sup> *Membrana basal*

Microscopicamente a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) consiste de alterações histológicas e citológicas no interior de ductos ou ácinos pré-existentes, geralmente multifocais (McNeal e Bostwick, 1986; Brawer, 1992; Bostwick, 1995).

Focos de LGPIN caracterizam-se por ductos ou ácinos contendo epitélio hiper celular, condensado e irregular, com marcada variação do tamanho nuclear. Núcleos alongados, hiper cromáticos e pequenos nucléolos podem estar presentes. A HGPIN é semelhante à LGPIN,

porém a alta da celularidade e a estratificação celular são mais evidentes e a variação do volume nuclear entre as células é menor, pois a maioria possui núcleo aumentado. A presença de nucléolo proeminente, freqüentemente múltiplo, é típica desta lesão e de grande utilidade diagnóstica (Bostwick, 1997). Quatro padrões arquiteturais foram inicialmente observados na HGPIN: sólido, micropapilar, cribriforme e plano (Bostwick, 1995).

Novos padrões histológicos vêm sendo relatados, entre eles: HGPIN com células em anel de sinete, HGPIN com pequenas células neuroendócrinas e HGPIN com características mucinosas (Reyes et al., 1997). Tais padrões já se encontram citados em artigos de revisão (Montironi et al., 2000; Bostwick e Qian, 2004), aumentando a abrangência das possibilidades morfológicas para estas lesões. Ainda, Berman et al. (2000) apresentaram um caso de HGPIN de glândulas espumosas e, recentemente, Mai et al. (2005) descreveram a ocorrência de uma variante envolvendo pequenos ductos e ácinos, gerando maior dificuldade na diferenciação das lesões com carcinoma prostático, e Melissari et al. (2006) relataram HGPIN com diferenciação escamosa.

A continuidade no desenvolvimento de LGPIN para HGPIN e deste para câncer invasivo é caracterizada pela interrupção da camada de células basais, perda progressiva de marcadores de diferenciação secretora, aumento de anormalidades nucleares e nucleolares, aumento

da atividade proliferativa, neovascularização, instabilidade genética e variação da quantidade de DNA (McNeal, 1989; Bostwick, 1997).

Ao mesmo tempo, os mecanismos de proliferação e diferenciação celular estão alterados na PIN, pois são observadas células basais diferenciadas de forma atípica, com potencial proliferativo, migrando para o compartimento secretor, enquanto no tecido normal ou hiperplásico a capacidade proliferativa é restrita à camada basal (Helpap, 1998). Com esta progressiva indiferenciação celular tende a ocorrer também a perda gradativa das células basais, facilitando a extensão da lesão para o estroma e sua transformação em carcinoma invasivo (Algaba, 1997).

A PIN tem crescimento lento podendo invadir a membrana basal e a partir deste evento passa a ser diagnosticada como câncer. Como o processo é lento, o diagnóstico de HGPIIN pode possibilitar o uso de terapias, visando a regressão da lesão e a não progressão para câncer (McNeal et al., 1995).

Atualmente existe um grupo de pesquisadores empenhados no desenvolvimento de agentes que previnam e tratem as neoplasias intra-epiteliais nos diferentes tecidos, supondo que desta forma poderia ocorrer uma redução no número de futuros casos de câncer invasivo (O' Shaughnessy et al., 2002).

A despeito da importância da avaliação do comportamento biológico destas lesões no cão, poucos trabalhos podem ser encontrados na literatura referindo HGPIIN em cães (Waters et al., 1997; Waters e

Bostwick, 1997a; Waters e Bostwick, 1997b; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998; Medewell et al., 2004; Rossignol et al., 2004), embora atualmente a lesão já seja mencionada em artigos de revisão (Johnston et al., 2000; Paclikova et al., 2006).

Os primeiros dados na literatura mencionando HGPIN em cães descrevem a presença desta lesão em 19 (66%) de 29 glândulas com diagnóstico prévio de adenocarcinoma. As características histopatológicas da HGPIN nas próstatas caninas foram similares às aquelas descritas na literatura humana (Waters et al., 1997).

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

A constatação de que a HGPIN apresentou-se de forma semelhante no cão e no homem em relação à morfologia, imunofenótipo e forte associação com câncer prostático (ocorrência concomitante),

permitiu que Waters e Bostwick (1997b) considerassem a próstata canina como modelo para a determinação dos fatores que regulam a carcinogênese prostática e a progressão maligna.

Nos Estados Unidos, Aquilina et al. (1998) realizaram um estudo retrospectivo envolvendo cães do serviço militar para verificar a presença de HGPIN em uma população que não estaria exposta aos hábitos e dieta dos humanos. Foram selecionadas lâminas contendo tecido prostático proveniente da necropsia de 199 animais sem diagnóstico de adenocarcinoma e 25 com a neoplasia. Entre as glândulas que não apresentavam adenocarcinoma, lesões características de HGPIN foram observadas em 3% dos casos, enquanto nas próstatas com diagnóstico de câncer a incidência foi de 72%. As médias de idade dos animais com HGPIN nos grupos citados foram de 9,3 e 9,6 anos, respectivamente. Os autores consideraram que a freqüente associação de HGPIN e adenocarcinoma é um forte indicativo de que esta seja uma lesão pré-cancerosa. Apesar da incidência da lesão ter sido baixa nos animais sem câncer prostático, acreditam que os valores podem ter sido subestimados pelo fato de haver apenas uma pequena amostra do tecido prostático na maioria dos casos.

De acordo com Bostwick et al. (2000), as vantagens na escolha do cão como modelo experimental para a PIN estão centradas em três fatores principais: cães podem ser um modelo espontâneo para PIN em um animal de maior porte, facilitando a avaliação por imagens e

intervenções terapêuticas; o tempo de vida dos cães é reduzido, tornando mais práticos os testes com agentes quimiopreventivos; e pelo mesmo motivo, os testes de novas estratégias terapêuticas. Os autores acrescentam que a epidemiologia e a biologia molecular da HGPIN e do carcinoma prostático em cães são considerados prioridades para investigações adicionais.

Mais recentemente, Rossignol et al. (2004) avaliaram 22 próstatas de cães acima de 7 anos, sem evidência clínica de doença prostática. Na análise morfológica inicial, não observaram casos de HGPIN, então utilizaram os anticorpos anti-citoceratina de alto peso molecular e anti-ki-67 para avaliação imunoistoquímica da camada de células basais e do índice proliferativo de quatro casos suspeitos para LGPIN e concluíram que tratavam-se de atrofia. Os autores reforçam que na próstata canina a camada de células basais é descontínua e não visível pela coloração de HE. Frente a estes resultados, os autores não acreditam que o cão possa ser modelo para a doença humana, considerando a prevalência nula de câncer prostático e de seus precursores no trabalho em questão, enquanto no homem tais lesões ocorrem freqüentemente.

Medewell et al. (2004) avaliaram 115 amostras de tecido prostático de cães, provenientes de necropsias ou biopsias. Entre 20 amostras de próstatas aparentemente saudáveis, nenhum foco de HGPIN foi observado, assim como nas 95 amostras contendo HPB. Entre as 20 amostras contendo carcinoma prostático (dez provenientes de biopsia e

dez de necropsia), sete apresentaram focos de HGPIN. Os autores concordam que o sincronismo entre HGPIN e carcinoma prostático no cão é importante, contudo não acreditam que seja possível traçar a progressão da HGPIN para câncer apenas utilizando biopsias. Além disso, destacam a baixa incidência de câncer prostático em cães, e a ausência de um marcador sérico que detecte doenças prostáticas em cães, visando uma triagem dos animais.

### **2.3) Inflamação da próstata e atrofia inflamatória proliferativa (PIA)**

A estreita relação anatômica entre a próstata, a uretra proximal e a bexiga urinária repercute na elevada frequência de infecções envolvendo estas três estruturas. O fluido prostático geralmente reflui para o interior da bexiga, e a urina pode entrar em contato com ductos prostáticos durante a micção (Barsanti, 1998).

A inflamação é sugerida como um fator etiológico capaz de incitar a carcinogênese por causar dano celular e no genoma; promover a substituição celular; e criar um microambiente no tecido rico em citocinas e fatores de crescimento que podem elevar a replicação celular, angiogênese e reparo tecidual (Palapattu et al., 2004). Portanto, no que refere à carcinogênese, a inflamação pode ser um agente iniciador, via efeitos genotóxicos, ou um agente promotor, via efeitos citotóxicos (Platz e De Marzo, 2004).

Prostatites agudas ou crônicas são processos freqüentes tanto no homem (Epstein, 1997; Platz e De Marzo, 2004); quanto no cão (Johnston et al., 2000; Paclikova et al., 2006) e são encontradas muitas vezes em concomitância com outras lesões prostáticas, como atrofia (Laufer Amorim, 2001; Di Santis, 2003; De Moura, 2004; Wang et al., 2004; De Marzo et al., 2006; Tomas et al., 2007), HPB (Mahapokai et al., 2001; Sciarra et al., 2002; Di Santis, 2003; Di Silverino et al., 2003), PIN (Ortiz et al., 1996) e câncer (Bell et al., 1991; Palapattu et al., 2004; Platz e De Marzo, 2004) em ambas as espécies.

A atrofia da próstata é identificada pela redução do volume de glândulas e estroma pré-existentes e pode ser dividida em dois maiores padrões: difusa e focal. A atrofia difusa resulta da diminuição de andrógenos circulantes e envolve a próstata como um todo, de maneira relativamente uniforme. Ao contrário, a atrofia focal não está relacionada à diminuição de andrógenos circulantes e ocorre como áreas de epitélio atrófico intercaladas com áreas de epitélio de aspecto normal (De Marzo et al., 1999b).

Feneley et al. (1996) observaram que o índice proliferativo no epitélio de lesões atróficas na zona periférica da próstata humana foi mais elevado que o de glândulas normais, hiperplásicas, com HGPIIN e com carcinoma da zona de transição, sendo apenas inferior ao do carcinoma da zona periférica. Diante de tal resultado e da associação topográfica

entre atrofia e câncer, os autores consideraram relevantes futuras investigações sobre o assunto.

Tendo em vista constatações prévias de que focos de atrofia prostática apresentavam caráter proliferativo, relação topográfica com câncer prostático e associação freqüente com inflamação, De Marzo et al. (1999b) realizaram um extenso estudo focado em caracterizar de forma abrangente o fenótipo de tais células para avaliar a viabilidade da proposta de que estas podem ser alvo de transformação neoplásica. Para tanto, utilizaram 55 amostras provenientes de 42 homens contendo focos de atrofia simples, hiperplasia pós-atrótica ou uma combinação das duas lesões.

A avaliação microscópica do material revelou que todos os casos continham inflamação crônica, e esta consistia principalmente de linfócitos com variado número de macrófagos. A maioria dos linfócitos (80-85%) era do tipo T, associados a linfócitos B, macrófagos e eventualmente a poucos eosinófilos e plasmócitos. Cerca de 60% das lesões apresentavam ainda inflamação aguda.

Houve também aumento do índice proliferativo em relação ao tecido normal, tanto no compartimento basal quanto no secretor; aumento na intensidade de marcação para bcl-2 nas células secretoras, assim como de GSTP1 (glutathione S-transferase classe- $\pi$ ), e diminuição da reatividade para p27<sup>kip1</sup> (inibidor de quinase ciclina-dependente).

Deste modo, foi proposto o termo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou hiperplasia pós-atrótica (PAH), ocorrendo em associação à inflamação (De Marzo et al., 1999b).

Os autores questionam ainda, que se as células estão proliferando rapidamente e não está havendo aumento na taxa de apoptose na PIA, as lesões deveriam estar crescendo em volume. Contudo, eles próprios sugerem que uma perda celular deva estar balanceando a proliferação, mas que não estaria ocorrendo por mecanismos apoptóticos. Acreditam que a injúria celular seja direta e que as células lesadas caiam no lúmen glandular e sejam expulsas no ejaculado ou capturadas por macrófagos. Além disso, crêem que o epitélio em regeneração suprima a morte celular programada, ao menos temporariamente, para substituir as células perdidas, fato que poderia explicar a expressão aumentada de Bcl-2 nas células secretoras da PIA, resultando em níveis muito baixos de apoptose e embasando o conceito de que a PIA é uma lesão regenerativa. Os fatores de crescimento poderiam estar sendo liberados tanto das células epiteliais lesadas quanto das células inflamatórias presentes.

Putzi e De Marzo (2000) avaliaram a relação topográfica entre HGPIN, PIA e adenocarcinoma prostático em humanos e observaram que nas amostras contendo HGPIN, esta se fundia com PIA em 42,5% das lesões, foi adjacente em 9%, próxima em 37% e distante em 11,5%. Nas amostras contendo carcinoma, este não se apresentou junto à PIA, mas

foi adjacente em 30,4% dos casos, próximo em 58,2% e distante em 11,4%. Quando avaliados quanto à HGPIN, os carcinomas fundiam-se com HGPIN em 23% das lesões, eram adjacentes em 33%, próximos em 30% e distantes em 30% dos casos. Frente a estes resultados, os autores acreditam que a PIA pode representar um precursor para PIN e/ou para carcinoma prostático, embora assumam que a relação topográfica não seja uma prova definitiva desta proposta.

Zha et al. (2001) constataram expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) nos focos de PIA, porém não em focos de HGPIN ou de carcinoma prostático. Wang et al. (2004) encontraram elevada expressão de COX-2 na PIA, inclusive associada à marcante expressão de bcl-2 e à alta taxa de proliferação. Estes autores acreditam que a inflamação crônica, principalmente linfócitos T e macrófagos, pode secretar vários fatores que causam a supra-regulação de COX-2 nas células epiteliais adjacentes, o que pode aumentar a proliferação e inibir a morte celular, indicando que agentes antiinflamatórios, particularmente inibidores de COX-2, poderiam prevenir o câncer prostático.

Além de elevada proliferação celular nos focos de PIA, detectada pela marcação com Ki-67, a intensa expressão de p16 (inibidor de quinase ciclina-dependente) nestas células aproximam a lesão do carcinoma prostático, visto que este também apresenta tais características (Faith et al., 2005).

Segundo De Marzo et al. (2003b), todas as formas de atrofia focal da próstata são proliferativas e a ampla maioria está associada à inflamação, de maneira que estas lesões podem se originar em um cenário de estresse oxidativo aumentado, possivelmente derivado das células inflamatórias próximas.

Muitas células em proliferação nos focos de PIA apresentam um fenótipo de célula secretora imatura, similar àquele da PIN e do carcinoma prostático, e poderiam ser estas células o principal alvo para a transformação neoplásica (Pearsons et al., 2001; van Leenders et al., 2003).

Inflamações agudas e crônicas, em conjunto com a dieta e outros fatores ambientais, atingem as células epiteliais prostáticas e resultam em injúria ou destruição celular. Ocorre aumento da proliferação como uma resposta regenerativa à perda de células epiteliais e diminuição da apoptose relacionada à expressão aumentada de Bcl-2, que já foi demonstrada nesse tecido (De Marzo et al., 2003b).

Segundo o modelo de carcinogênese prostática proposto por Palapattu et al. (2004), a PIA é descrita como uma resposta das células epiteliais prostáticas normais a um microambiente de estresse. Regiões individuais de PIA que são inábeis para se defender adequadamente contra o dano oxidativo do genoma podem subseqüentemente progredir para PIN ou câncer prostático. Muitos, mas não todos os focos de HGPIN podem se desenvolver passando primeiro por um período de atrofia.

Neste cenário, algumas lesões atróficas associadas à inflamação poderiam progredir para câncer passando inicialmente por HGPIIN. Outras vezes, a atrofia poderia prosseguir diretamente para carcinoma, sem uma fase prévia de HGPIIN. Outros tipos de câncer parecem se desenvolver a partir da HGPIIN, sem a associação de atrofia, enquanto outros ainda manifestam-se sem qualquer evidência de lesões precursoras próximas.

Tendo em vista o crescente interesse no estudo de lesões atróficas focais da próstata humana, De Marzo et al. (2006) propuseram uma nova classificação para estas alterações considerando quatro padrões arquiteturais: atrofia simples, atrofia simples com formação de cistos, hiperplasia pós-atrótica e atrofia parcial. Quando mais de um tipo é encontrado, a lesão é considerada como mista.

Os autores incluíram ainda, de forma mais genérica, os termos atrofia inflamatória proliferativa (PIA) e atrofia proliferativa (PA) para designar lesões atróficas focais, com aumento do índice proliferativo, nas quais a inflamação esteja presente ou ausente, respectivamente. Para os subtipos atrofia simples com formação de cistos e atrofia parcial, ainda permanece indeterminado se há aumento no índice proliferativo, portanto tais subtipos não são atualmente considerados PIA ou PA.

Este sistema de classificação baseou-se apenas em características morfológicas e sua fidedignidade foi testada entre 34 patologistas com diferentes níveis de experiência. Os resultados mostraram excelente confiabilidade tanto interobservador quanto intra-observador. Tal sistema

deve facilitar futuros estudos designados para focar o possível papel dos vários padrões de atrofia parcial da próstata na etiologia do câncer prostático. Os autores sugerem ainda que este sistema seja utilizado para tais estudos, mas pelo fato de não ser conhecido o significado clínico destas lesões não recomendam que os patologistas comentem ou quantifiquem estas lesões em biopsias (De Marzo et al., 2006).

Recentemente, um estudo avaliou os diferentes tipos de atrofia prostática focal utilizando o novo sistema de classificação proposto por De Marzo et al., 2006. Primeiramente classificaram as lesões em dois grupos maiores: PA e PIA, e posteriormente nos subtipos de atrofia. Encontraram PA e PIA em todas as glândulas avaliadas (n=81). Próstatas com HPB apresentaram mais PA que PIA, enquanto aquelas com carcinoma prostático continham mais PIA que PA. Na PIA, o infiltrado consistia predominantemente de linfócitos, com variado número de macrófagos. Constatou-se ainda que na PIA houve baixa frequência de apoptose e alto índice proliferativo (Tomas et al., 2007).

Até o momento, apenas um trabalho estudou casos de PIA na próstata canina buscando avaliar seu papel na evolução do câncer prostático e, embora não tenha examinado o aspecto proliferativo da lesão, encontrou imunomarcação para COX-2 e TGF- $\beta$  no epitélio destas células em quantidade intermediária, entre tecido prostático normal e carcinoma prostático (Rodrigues, 2007).

Em trabalhos anteriores constatou-se um grande número de próstatas caninas apresentando inflamação aguda ou crônica em associação topográfica com focos de atrofia glandular acompanhados de atipias epiteliais (Laufer Amorim, 2001; Di Santis, 2003; De Moura, 2004), o que enfatiza a importância da caracterização destas lesões no cão.

#### **2.4) Bases moleculares da carcinogênese e biomarcadores com valor prognóstico em lesões prostáticas**

Em condições fisiológicas a regulação da proliferação celular é controlada por duas classes de genes: proto-oncogenes e antioncogenes (Weinberg, 1996; Rodrigues e Camargo, 1999). Antioncogenes ou genes supressores de tumores codificam proteínas que agem inibindo a proliferação celular, como por exemplo, a proteína p-53 (Leong e Leong, 1998; Rodrigues e Camargo, 1999).

Danos no DNA que levem à inativação dos genes supressores podem dar origem à proliferação celular desordenada, assim como favorecer o acúmulo de mutações e a instabilidade progressiva do genoma (Weinberg, 1996; Leong e Leong, 1998; Rodrigues e Camargo, 1999).

Marcadores que identificam células em proliferação, oncoproteínas inibidoras de apoptose, proteína p-53 e E-caderina, assim como a determinação de alterações na morfologia nuclear por análise quantitativa computadorizada de imagens (AQCI) são considerados biomarcadores

com valor prognóstico nas lesões pré-malignas e malignas de vários tecidos, inclusive da próstata (Boone e Kelloff, 1997; Helpap, 1998; O'Shaughnessy et al., 2002).

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

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

Stricker et al. (1996) examinaram 40 próstatas de indivíduos com câncer localizado, isto é, sem características clínicas de progressão. A proteína p-53 foi positiva em 80% dos carcinomas, sendo que destes 62,5% mostraram evidência posterior de progressão. Por outro lado, em nenhum dos casos negativos para p-53, o câncer progrediu.

Cheng et al. (1999) avaliaram a super-expressão de p-53 nas próstatas de 55 pacientes humanos submetidos à prostatectomia radical, indicada pela recorrência de câncer após terapia radiativa. O exame histopatológico revelou que as neoplasias recorrentes eram biologicamente agressivas e que 28 pacientes apresentavam HGPIN concomitante. O acúmulo nuclear de p-53, observado em 91% dos

pacientes relacionou-se com o fenótipo agressivo dos tumores e a positividade em 68% dos focos de HGPIN corroborando com a suposição de que esta é uma lesão pré-maligna.

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

Não há dados na literatura quanto à expressão de p-53 nas afecções da próstata canina, porém, em carcinomas inflamatórios mamários de cadelas, a expressão de p-53 foi relacionada com um pior comportamento clínico e agressividade do ponto de vista anátomo-patológico (Pena et al., 2003).

O bcl-2, gene responsável pela inibição da apoptose, expressa-se no citoplasma das células basais ducto-acinares em próstatas humanas normais e hiperplásicas. Johnson et al. (1998) notaram que há expressão de bcl-2 no epitélio secretor displásico da HGPIN, enquanto Haussler et al. (1999) e Baltaci et al. (2000) constataram tal expressão tanto no epitélio secretor quanto basal em casos de LGPIN e HGPIN. Tais resultados confirmaram os achados de McNeal et al. (1995) e sugerem que a auto-sustentação das células secretoras, pela expressão aberrante

de bcl-2, predispõe o epitélio displásico à instabilidade genética, o que pode gerar um fenótipo invasivo.

Em carcinomas prostáticos humanos sem metástases, Moul et al. (1996) observaram que a superexpressão de bcl-2, assim como de p-53, tem valor prognóstico independente na previsão de recorrência da doença após prostatectomia, o que justificaria a utilização destes marcadores na rotina diagnóstica de câncer prostático humano.

O mecanismo de apoptose é executado por uma cascata de ativação seqüencial de caspases iniciadoras e efetoras. Há duas famílias de caspases, de acordo com o comprimento de seu domínio terminal NH<sub>2</sub>. As caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9 e 10 têm longos domínios e tem função em regular a apoptose. Caspases 3, 6 e 7 têm domínios curtos e são responsáveis pela execução da apoptose. A caspase 3 é a executora terminal, essencial para as alterações nucleares associadas à apoptose (Winter et al., 2001).

Hausler et al. (1999) observaram aumento do índice apoptótico em LGPIN e HGPIN em comparação ao tecido benigno utilizando o método TUNEL para identificação de células em apoptose. Por outro lado, Winter et al. (2001) encontraram diminuição da expressão de caspase 3 em carcinomas prostáticos, quando comparada ao tecido normal, ao mesmo tempo em que houve maior expressão de bcl-2. Do mesmo modo, Ananthanarayanan et al. (2006) notaram diminuição da expressão de

caspase 3 em carcinomas e em focos de HGPIN em relação ao tecido normal.

O antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) e o antígeno nuclear Ki-67, podem ser usados pelo método imunohistoquímico para avaliação da proliferação celular (de Mello e Alves, 1999).

A detecção de PCNA mostrou-se útil na avaliação comparativa do índice proliferativo entre o epitélio prostático normal e focos de HGPIN (McNeal et al., 1995). Utilizando o marcador Ki-67 no epitélio normal, em áreas de HGPIN e de câncer prostático, Johnson et al. (1998) observaram índice proliferativo de 0,62%, 2,82% e 6,05%, respectivamente. Empregando a mesma técnica, os resultados de Cheng et al. (1999) são semelhantes, com médias respectivas às lesões citadas de 0,4%, 3,1% e 7,0%. Neste último estudo notou-se também que o aumento da atividade proliferativa nos carcinomas estava associado ao aumento da expressão de p-53.

Ainda, o estudo de Feneley et al. (1996) revelou índice proliferativo médio de 0,77% no epitélio normal, 1,5% na HPB, 2,58% na HGPIN e 5,25 nos carcinomas da zona periférica. Embora nem todos os resultados tenham sido estatisticamente diferentes, a posição intermediária da HGPIN entre o tecido normal e carcinoma invasivo é consistente com a suposição de que esta é uma lesão pré-maligna.

Reforçando esta teoria, Helpap (1995) observou que a média do índice proliferativo na HGPIN estava entre a dos carcinomas de baixo e

alto grau, resultados confirmados por quatro diferentes métodos: trimidina tritiada, AgNOR, PCNA e Ki-67.

Em relação aos carcinomas prostáticos, Leite et al. (1999) aplicando a técnica de imunomarcção com PCNA e p-53, notaram que quanto maior a expressão de p-53, maior o índice proliferativo, sugerindo que uma mutação no gene p-53 possa elevar o índice proliferativo das células neoplásicas. Neoplasias prostáticas de alto grau, assim como aquelas em estágio avançado, também exibem índices de proliferação e expressão de bcl-2 e p-53 maiores (Moul et al., 1996).

Em casos de hiperplasia pós-atrófica, um tipo específico de atrofia proliferativa, freqüentemente associada à inflamação, observou-se alto índice proliferativo, alterações cromossomais (Shah et al., 2001) e elevada freqüência de mutações no gene p53 (Tsujiimoto et al., 2002), aproximando o fenótipo desta lesão ao do carcinoma prostático.

Além de permitirem a determinação do índice proliferativo e avaliação prognóstica, PCNA e Ki-67 podem ser úteis na identificação do tipo celular em proliferação. Mc Neal et al. (1995) utilizando PCNA e Leav et al. (1996) Ki-67, concluíram que na presença de displasia epitelial (PIN), as células que se encontram positivas em maior número são as do epitélio secretor, enquanto no tecido normal o predomínio de positividade está entre as células basais. Ainda, a expressão de receptores para andrógenos (AR) em células do epitélio secretor, positivas para Ki-67, nos

focos displásicos sugeriu capacidade proliferativa mediada por hormônios androgênicos (Leav et al., 1996).

Regiões organizadoras de nucléolos (NORs) podem ser visualizadas em microscopia óptica como pontos escuros no núcleo (AgNOR) utilizando-se uma técnica de impregnação pela prata (Smith et al., 1988; de Mello e Alves, 1999).

AgNORs podem apresentar-se como uma estrutura redonda e solitária, como agrupamentos de pequenos pontos ou como pontos espalhados na matriz nuclear, sendo este último tipo, observado freqüentemente em neoplasias malignas. Tanto a morfologia quanto o número destas estruturas em um núcleo têm valor prognóstico em algumas lesões e permitem estimar a atividade proliferativa (Crocker et al., 1989).

Hansen e Ostergard (1990) relatam que o número de AgNORs nos núcleos celulares de próstatas hiperplásicas é significativamente diferente dos valores obtidos na HGPIN e em adenocarcinomas, entretanto entre estas duas lesões não houve diferença estatística, pois, assim como observado por Helpap e Riede (1995), o número de AgNORs por núcleo em focos de PIN é intermediário entre o observado em carcinomas de baixo e alto grau.

A contagem de AgNORs foi considerada por Chiusa et al. (1997) como de valor prognóstico independente quando correlacionada com o tempo de sobrevida de pacientes com carcinoma prostático. Em relação à

morfologia das AgNORs, células de carcinomas grau 1 mostravam um pequeno número de grandes agrupamentos de AgNORs, geralmente reunidos no centro do núcleo, carcinomas grau 2 tinham maior número de AgNORs reunidos em dois ou três grupos, e carcinomas grau 3 apresentavam inúmeros pequenos pontos espalhados no núcleo.

A proteína E-caderina é o principal mediador das interações intercelulares no tecido epitelial, sendo essencial na manutenção da coesão celular, cuja perda relaciona-se ao caráter invasivo e metastatizante de algumas neoplasias (Pignatelli, 1993; Leong e Leong, 1998).

Ross et al. (1994) concluíram que uma perda significativa da expressão de E-caderina pode ser observada no carcinoma prostático em relação ao epitélio normal e nos carcinomas pouco diferenciados em relação aos bem diferenciados. De forma semelhante, De Marzo et al. (1999c) relatam que a imunoreatividade para E-caderina é intensa em mais de 85% das células normais, enquanto para carcinomas prostáticos há redução destes níveis conforme aumenta o grau de malignidade.

O epitélio prostático normal expressa E-caderina abundantemente nas áreas de contato entre as células. Em carcinomas prostáticos a perda progressiva na expressão de E-caderina correlaciona-se com as neoplasias de alto grau, assim como está associada ao estágio da neoplasia, ocorrência de metástases, sobrevida e progressão da doença após prostatectomia radical (Paul et al., 1997).

A morfometria, baseada na mensuração quantitativa, foi introduzida para substituir a avaliação subjetiva de inúmeras características histopatológicas. Tendo em vista as variações morfológicas observadas nos núcleos de células neoplásicas, a avaliação destas estruturas por análise quantitativa computadorizada de imagens (AQCI) tem sido realizada buscando a padronização de mensurações com valor prognóstico no câncer prostático (Diamond et al., 1982; Nafe e Frohneberg, 1989).

O fator de circunferência nuclear é definido como o grau pelo qual o núcleo celular em corte transversal se aproxima de um círculo perfeito, sendo calculado com base no perímetro e área nuclear (Epstein et al., 1984). Diante disso, Nafe e Frohneberg (1989) avaliaram o fator de circunferência nuclear em amostras de carcinoma prostático humano. O coeficiente resultante mostrou-se mais alto em pacientes que desenvolveram metástases após cirurgia, com diferença significativa entre os que estavam livres de metástases. Estes resultados estão de acordo com o estudo prévio conduzido por Diamond et al. (1982) que consideraram, com base na forma nuclear avaliada por AQCI, a possibilidade de distinguirem-se neoplasias com alto risco metastático das pouco agressivas.

Epstein et al. (1984) observaram que em um determinado grupo de tumores com o mesmo estágio clínico e grau histológico (intermediário), o fator de circunferência nuclear pôde separar estas neoplasias em dois

subgrupos correlacionando-os com o prognóstico clínico em relação à progressão do câncer, sendo os pacientes acompanhados por quatro anos após a análise.

Boone e Kelloff (1997) acrescentam que a contagem de AgNORs, especialmente por AQCI é um bom biomarcador da PIN, pois alterações na morfologia nucleolar foram correlacionadas com o grau de progressão desta lesão.

Frente ao exposto, o estudo de biomarcadores que melhor caracterizem o potencial pré-maligno de lesões proliferativas no cão, como HGPIIN e PIA, deve ser realizado para o conhecimento da carcinogênese prostática nesta espécie e elucidação de dados controversos encontrados na literatura no que se refere à frequência e morfologia das lesões displásicas da próstata canina.

### **3) MATERIAL E MÉTODOS**

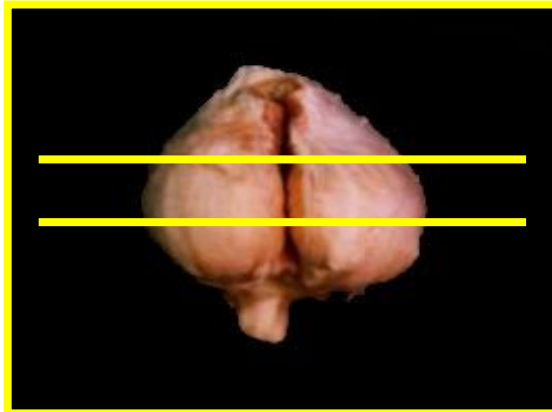
#### **3.1) Local da pesquisa e material utilizado**

A pesquisa foi realizada nas dependências do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

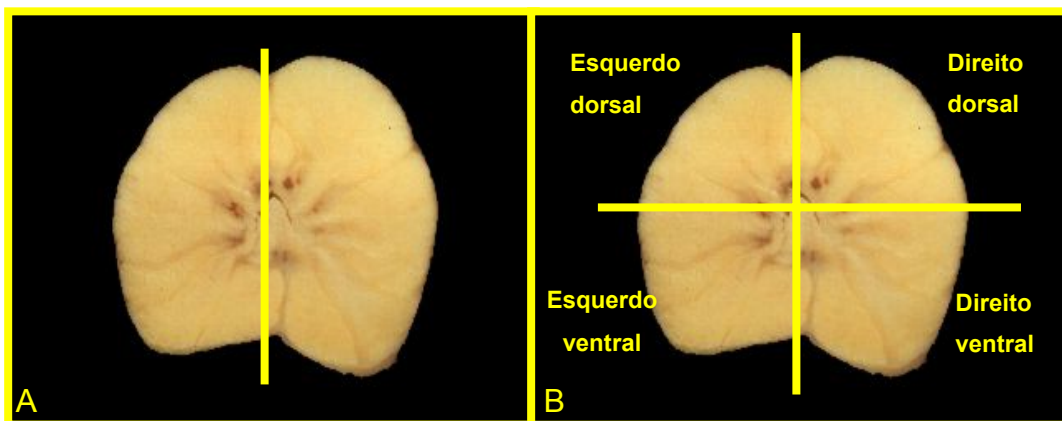
Foram selecionados 64 blocos de parafina correspondentes a amostras das próstatas de 21 cães, não castrados e adultos, com referência à displasia epitelial no diagnóstico histopatológico, mesmo que associada a outras alterações. Foram ainda selecionados 10 campos normais para fins de comparação de resultados.

O material é proveniente do laboratório supracitado, coletado para pesquisas com próstata canina entre os anos de 2000 e 2003.

O número de amostras é superior ao de animais, pois foram coletados entre três e doze fragmentos de cada próstata, a depender do volume da glândula. Realizaram-se cortes transversais, de forma que cada fragmento incluísse amostras dos dois lobos prostáticos, correspondendo às porções cranial, média e caudal (Figura 3). Em casos de glândulas muito volumosas, procedeu-se a secção na região do septo interlobular originando seis fragmentos de cada órgão (Figura 4A). Se ainda assim não coubessem nos cassetes de inclusão eram novamente divididos em porção dorsal e ventral originando doze fragmentos (Figura 4B).



**Figura 3:** Representação dos cortes realizados nas glândulas dividindo-as em três porções (cranial, média e caudal).



**Figura 4:** Representação dos cortes realizados nas glândulas na região do septo interlobular (A), ou subdividindo-as em porção dorsal e ventral (B) quando necessário.

### **3.2) Preparo e avaliação das lâminas**

Cortes histológicos com 5 $\mu$ m de espessura, corados com hematoxilina e eosina (HE) foram obtidos, para avaliação histopatológica. A seleção dos casos de HGPIN seguiu os critérios morfológicos apresentados por Bostwick (1995), sendo esta a classificação atualmente utilizada em próstatas humanas.

Para escolha dos casos de PIA, utilizou-se os critérios propostos por De Marzo et al. (1999), desconsiderando o tipo de atrofia. Ainda, os casos de PIA foram subdivididos em três subgrupos, de acordo com o grau de inflamação adjacente ao foco (discreta, moderada ou intensa), adaptando-se aos achados histológicos os critérios propostos por Nickel et al. (2001) para a classificação de prostatite crônica humana. Desta forma, considerou-se a inflamação discreta quando havia poucas células inflamatórias, espaçadas em sua maioria; moderada onde se observaram agregados de células inflamatórias sem destruição tecidual ou formação de folículos ou nódulos linfóides; e intensa quando existiam agregados confluentes de células inflamatórias com destruição tecidual ou formação de folículos ou nódulos linfóides.

### **3.3) Padronização da técnica de imunoistoquímica**

A realização da imunoistoquímica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, contudo diversos testes quanto à diluição dos anticorpos e à recuperação antigênica foram realizados, considerando a necessidade de adaptações frente às indicações dos fabricantes, pois são todos produzidos para uso em tecido humano.

### **3.3.1) Roteiro usado na aplicação da técnica**

Os blocos de parafina selecionados foram cortados em micrótomo com espessura de 3  $\mu\text{m}$  e as amostras passadas para lâminas de vidro, previamente tratadas com Organosilano<sup>a</sup> com o objetivo de promover a adesão dos cortes às lâminas, e estas colocadas em estufa por 24 horas com temperatura entre 55 e 56° C.

Depois de retiradas da estufa foram colocadas em uma cuba vertical de vidro onde seguiu a desparafinização das amostras por imersão em xilol durante quarenta minutos, sendo substituído em seguida por xilol novo durante vinte minutos, sempre em temperatura ambiente. As lâminas foram então retiradas da cuba, secas com papel filtro e colocadas em outra na qual foram passadas três vezes em álcool absoluto (cinco minutos em cada), uma vez em álcool 95° (cinco minutos) e uma vez em álcool 85° (cinco minutos). A fim de retirarem-se os pigmentos de formol, as lâminas foram mantidas por dez minutos em solução alcoólica de hidróxido de amônia a 10%. Posteriormente, para hidratação do material, as lâminas foram lavadas em água destilada por dez minutos.

Iniciou-se então a recuperação antigênica, com o propósito de liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol tamponado a 10%). Este processo variou conforme o anticorpo primário a ser empregado. Solução de citrato pH 6,0 ou de EDTA pH 8,0 foi previamente aquecida a 97°C em banho Maria, em

---

<sup>a</sup> Sigma cód. A3648

seguida as lâminas foram colocadas na solução e permaneceram nesta mesma temperatura por trinta minutos. Após o término desta fase as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente durante vinte minutos para arrefecimento, sendo posteriormente lavadas com água destilada por dez minutos.

A fase seguinte consistiu do bloqueio da peroxidase endógena por imersão das lâminas em uma solução composta por partes iguais de peróxido de hidrogênio a 20 volumes e água destilada (anticorpos com marcação citoplasmática) ou álcool metílico (anticorpos com marcação nuclear) durante vinte minutos. Quando completavam dez minutos a solução era trocada por uma nova (preparada no momento do uso). Em seguida o material foi lavado por dez minutos em água destilada e banhado duas vezes, de cinco minutos cada, em solução de TRIS.

O material foi incubado durante uma hora com BSA 1% no intuito de reduzir a coloração de fundo. Então, os anticorpos primários foram diluídos em solução de BSA 1%, sendo em seguida aplicados às amostras, e estas incubadas em câmara úmida por 18 horas (*“over-night”*) à temperatura de 4°C.

O controle negativo para proteínas inespecíficas foi realizado substituindo-se o anticorpo primário por BSA 1% (o mesmo utilizado na diluição dos anticorpos). Como controle negativo específico, substituiu-se

o anticorpo primário monoclonal ou policlonal por imunoglobulinas produzidos em camundongo<sup>b</sup> e em coelho<sup>c</sup>, respectivamente.

Para diminuição das reações inespecíficas dos anticorpos policlonais que geram coloração de “fundo”, utilizou-se ainda soro normal de cabra<sup>d</sup> antes da incubação dos anticorpos primários.

Após este período procedeu-se a lavagem das amostras em solução de TRIS (dois banhos de cinco minutos cada), a incubação com anticorpo biotilado e posteriormente com a solução streptavidina-peroxidase, ambas do kit LSAB<sup>e</sup>, por 30 minutos cada reação, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Entre as duas reações e ao final da segunda lavaram-se as amostras com TRIS por duas vezes de cinco minutos cada. Utilizou-se ainda, para os anticorpos primários p53 e caspase 3, o sistema de visualização EnVision Dual Link<sup>f</sup> composto por um polímero ligado ao anticorpo secundário e à peroxidase, compatível com anticorpos primários produzidos em camundongos (monoclonais) e em coelhos (policlonais). O produto foi aplicado sobre os cortes onde permaneceu por 30 minutos, após este período o material seguiu o mesmo protocolo utilizado para o kit LSAB.

Para visualização da reação, os cortes foram cobertos com cromógeno (DAB líquido+)<sup>g</sup>, preparado no momento do uso, durante

---

<sup>b</sup> Negative Control Mouse, Dako Cytomation, cod. N1698, Via Real, Carpinteria, CA, USA

<sup>c</sup> Negative Control Immunoglobulin, Dako Cytomation, cod. X0903, Carpinteria, CA, USA

<sup>d</sup> Goat Serum (Normal), Dako Cytomation, cód. X0907, Via Real, Carpinteria, CA, USA

<sup>e</sup> Dako cód. K0690

<sup>f</sup> Dako cód. K4061

<sup>g</sup> Dako cód. K3468-1

cinco a trinta minutos, a depender do anticorpo primário, e logo depois banhados em TRIS, para a interrupção da reação, e então lavados em água destilada por dez minutos.

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por um minuto, lavadas em água corrente por dez minutos, passadas uma vez em água destilada e desidratadas. Esta etapa consistiu-se de uma passagem em álcool 85°, uma em álcool 95°, três em álcool absoluto e três em xilol, cada etapa durando cinco minutos. Cobriram-se as lâminas com lamínulas, aderindo-as com resina sintética Permount<sup>h</sup>. Os roteiros para preparo dos reagentes e soluções aqui citados estão detalhadamente descritos no Anexo A.

### **3.3.2) Amostras utilizadas na padronização dos anticorpos em tecido canino**

As amostras utilizadas na padronização das técnicas de imunistoquímica variaram de acordo com o anticorpo a ser testado e encontram-se detalhadamente descritas no Anexo A.

A Tabela 1 relaciona as diluições, recuperações antigênicas, o tempo de cromógeno, o kit secundário e os controles positivos para cada anticorpo padronizado da forma como foram efetivamente utilizados.

---

<sup>h</sup> Fisher Scientific cód. SP15-500

**Tabela 1: Anticorpos padronizados para uso na próstata canina.**

<b>Anticorpo (clone) marca, código</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação Antigênica</b>	<b>Controle Positivo</b>	<b>Kit secundário</b>	<b>DAB</b>
PCNA (PC-10) Novocastra, NCL- PCNA	1:100	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Células basais em ácinos prostáticos	LSAB	5'
Ki-67 (Mib-1) Dako, M7240	1:50	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Células basais em ácinos prostáticos	LSAB	10'
E-caderina (NCH- 38) Dako, M3612	1:50	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Epitélio secretor prostático normal	LSAB	10'
CD-3 (policlonal) Dako, A0452	1:100	Sol. EDTA pH 8.0, BM, 30'	Linfonodo canino	LSAB	12'
CD79a (HM57) Dako, M7051	1:50	Sol. EDTA pH 8.0, BM, 30'	Linfonodo canino	LSAB	12'
p-53 (policlonal) Novocastra, NCL- p53-CM1	1:600	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Carcinoma de células escamosas canino	EnVision	7'
Caspase 3 (policlonal) Cell Signaling, #9661	1:200	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Tonsila canina	EnVision	10'
*Bcl-2 (2/100/D5) Novocastra, NCL-bcl-2	-	-	-	-	-

BM: Banho Maria. Sol: solução. \* Não foi obtida marcação com este anticorpo.

### **3.4) Análise imunoistoquímica**

A imunofenotipagem do infiltrado inflamatório foi baseada na marcação com os com anticorpos CD-3 e CD-79a, avaliando-se o número de linfócitos positivos para cada anticorpo em cem células mononucleares contadas nas áreas adjacentes aos focos de PIA, em cada lâmina. Esta

avaliação não foi realizada nos ácinos normais, onde raras células inflamatórias são encontradas, ou nos focos de HGPIN, visto que somente foram utilizados neste trabalho aqueles que não apresentavam inflamação adjacente.

A determinação do índice proliferativo (IP) consistiu do percentual de células com marcação nuclear positiva para PCNA ou Ki-67 em cem células epiteliais contadas nos focos de HGPIN e de PIA para cada anticorpo, por lâmina. A positividade para p-53 e caspase 3 (índice apoptótico) foi avaliada utilizando-se os mesmos critérios anteriormente descritos para os anticorpos Ki-67 e PCNA.

Para avaliação dos resultados obtidos nos ácinos contendo HGPIN e PIA com marcação da membrana citoplasmática para o anticorpo e-caderina, utilizou-se um sistema de escore, onde "0" foi atribuído para marcação ausente, muito fraca e/ou muito esparsa; "1" para marcação de intensidade fraca a moderada e heterogênea; "2" para marcação de intensidade fraca a moderada e homogênea; "3" para marcação de intensidade forte e heterogênea; "4" para marcação de intensidade forte e homogênea. Os focos de HGPIN e PIA foram avaliados por completo em cada lâmina e os escores foram atribuídos de acordo com o padrão predominante de marcação. Para fins de comparação, dez campos contendo ácinos normais, provenientes de dez lâminas diferentes foram avaliados com a mesma metodologia.

Todas as avaliações supracitadas foram realizadas em microscópio óptico com objetiva de 40 vezes. Para todos os parâmetros avaliados seguiu-se o mesmo protocolo em dez lâminas de animais diferentes contendo ácinos normais.

### **3.5) Coloração de AgNOR**

A coloração que permite a visualização das NOR's baseou-se na técnica proposta por Ploton et al. (1986), contudo algumas modificações foram realizadas visando melhores resultados no que diz respeito à sedimentação de sais de prata. A identificação das NOR's foi realizada em objetiva de 100 vezes com óleo de imersão, situação em que tais estruturas foram contadas e analisadas morfológicamente. A técnica de coloração, assim como os reagentes e soluções utilizadas estão descritos no Anexo A.

O padrão morfológico de AgNOR's foi classificado de acordo com Crocker et al. (1989), considerando-se o aspecto predominante nos focos de HGPIN, PIA e nos ácinos normais. Desta forma, atribuiu-se o escore "1" para a presença de NOR's completamente agregadas, formando uma estrutura solitária, correspondendo ao nucléolo; "2" para a presença de NOR's individualizadas, porém compondo um mesmo nucléolo; e "3" para a presença de pequenas NOR's dispersas pelo núcleo.

O número de AgNORs por núcleo foi obtido pela média da contagem em 100 núcleos nos focos de HGPIN e PIA por lâmina e em dez lâminas diferentes contendo ácinos normais.

### **3.6) Análise Morfométrica**

Um sistema computadorizado de análise de imagens (KS-300 versão 3.0, Zeiss) foi utilizado para a determinação da área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ ), do perímetro nuclear ( $\mu\text{m}$ ) e do fator de circunferência nuclear contornando-se manualmente com núcleos dos focos de HGPIN e PIA por lâmina, assim como com núcleos de células normais provenientes de dez lâminas diferentes. O fator de circunferência nuclear foi calculado pelo próprio programa supracitado levando em consideração o perímetro e a área nuclear, onde o valor 1,000 corresponde a um círculo perfeito. As lâminas utilizadas nesta avaliação foram coradas pela técnica de HE.

### **3.7) Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas descritivas, utilizou-se o procedimento PROC UNIVARIATE do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, versão 8.2 2001). Para verificar a diferença de marcação dos anticorpos CD3, CD79a, KI-67, PCNA e caspase-3, diferenças no número de AgNOR's por núcleo e nas avaliações morfométricas, em que mensurou-se área nuclear, perímetro nuclear e fator de circunferência nuclear utilizou-se o procedimento PROC GLM do Software supracitado.

Quando verificado o coeficiente de variação (CV = Desvio Padrão / Média x 100) superior a 30%, procedeu-se os testes com as variáveis transformadas em Logaritmo (Sampaio, 2002) e a análise de variância deu-se pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%, de acordo com os modelos matemáticos descritos abaixo:

LOG X = Y portanto  $x = b^y$  em que;

Y = Valor de log de x na base b;

X = Valor real da variável;

B = Base logarítmica (3).

$$dms_{(Tukey)} = \frac{\bar{Y}_i - \bar{Y}_j}{s \sqrt{(\frac{1}{N_i} + \frac{1}{N_j})/2}} \geq q(\alpha; k, v) \text{ em que:}$$

$dms_{(Tukey)}$  = Diferença mínima significativa;

$\bar{Y}_i$  = Média do grupo;

$\bar{Y}_j$  = Média geral;

$N_i$  = Número de observações por grupo;

$N_j$  = Número de observações total;

S = Raiz dos quadrados médios;

q = Valor tabelado por Tukey;

$\alpha$  = Nível de significância = 5%;

k = variável independente;

v = graus de liberdade.

Para verificar a diferença de marcação do anticorpo E-caderina, em que os dados foram obtidos por intensidade de marcação, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal – Walis por meio do procedimento PROC RANK do programa computacional supracitado através do modelo matemático descrito abaixo:

$$T = \frac{1}{S^2} \left[ \sum_{i=1}^k X \frac{R_i^2}{n_i} - \frac{N(N+1)^2}{4} \right] \text{ onde:}$$

$n_i$  = número de observações para o i-jésimo grupo;

$$N = \sum_{i=1}^k n_i \text{ (total de observações);}$$

$R_i$  = soma das observações para o i-jésimo grupo;

$$s^2 = \frac{1}{N-1} \left[ \sum X_{ij}^2 - \frac{N(N+1)^2}{4} \right]$$

$X_{ij}$  = ordenação de cada j-ésima observação de cada i-jésimo grupo.

Quando verificada a significância pelo teste supracitado, utilizou-se o procedimento PRO GLM do software citado acima, para averiguar a diferença entre as médias ordenadas pelo Teste de Tukey, de acordo com o modelo descrito anteriormente.

Para verificar a correlação do índice proliferativo entre os anticorpos KI-67 e PCNA, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson “ $r_{xy}$ ” pelo procedimento PROC CORR do software citado anteriormente, de acordo com o modelo matemático abaixo:

$$r_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^n X_i\right)\left(\sum_{i=1}^n Y_i\right)/n}{\sqrt{\left[\sum_{i=1}^n X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n X_i\right)^2/n\right]\left[\sum_{i=1}^n Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n Y_i\right)^2/n\right]}}$$

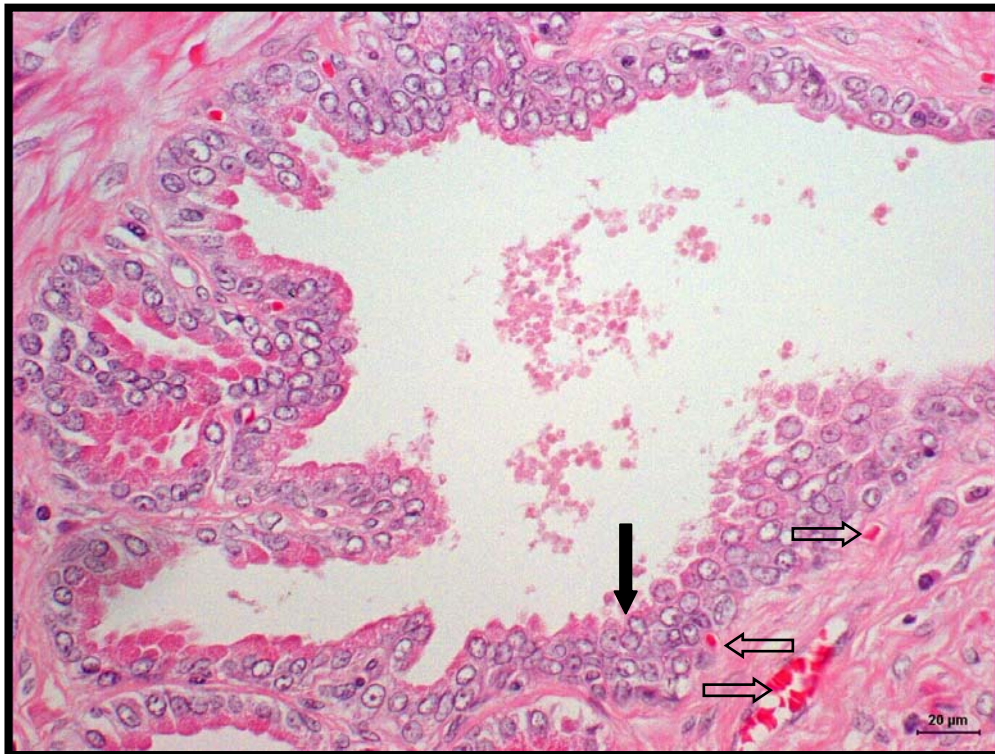
Com exceção do teste de correlação, todas as análises acima citadas foram realizadas de duas maneiras: apenas entre os grupos principais (normal, HGPIIN e PIA) e entre os grupos normal, HGPIIN e os subgrupos de PIA, como consta no item 3.2.

## **4) RESULTADOS**

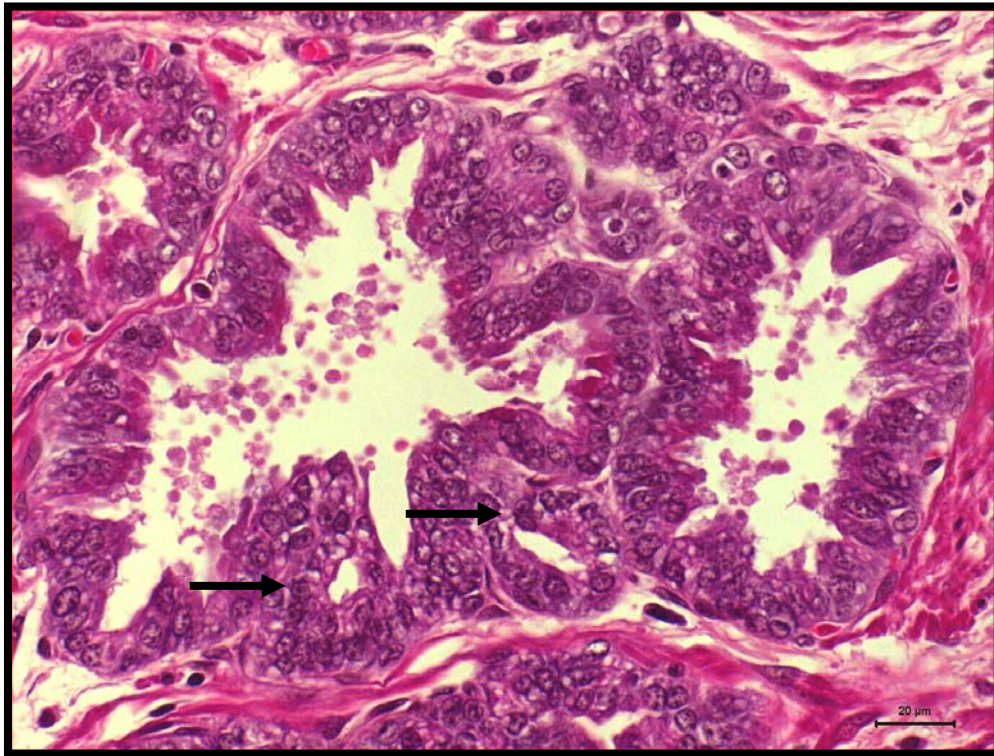
### **4.1) Aspectos gerais dos casos de HGPIN e PIA**

A classificação citohistológica das amostras de acordo com os critérios de Bostwick et al. (1995) resultou em oito amostras classificadas como PIN de alto grau, provenientes de cinco animais. O mais jovem tinha seis anos e o mais velho dez. Entre estes, um apresentava concomitantemente adenocarcinoma prostático.

As Figuras 5 e 6 representam o aspecto microscópico de casos de HGPIN em cão, onde é possível observar-se agrupamento e estratificação de células secretoras, com aumento de volume e variação da forma nuclear, além de nucléolos ocasionalmente a frequentemente proeminentes, eventualmente múltiplos. Nas células mais próximas ao lúmen, foi freqüente a perda de diferenciação citoplasmática em graus variados. Todas estas alterações eram observadas no interior de ductos e ácinos pré-existentes, sem invasão de células para o estroma, embora não seja possível, como é em humanos, a avaliação da integridade da camada de células basais. As lesões apresentaram em geral padrão de crescimento papilar, eventualmente tendendo ao cribriforme.



**Figura 5: Próstata canina. Foco de HGPIN onde se observam estratificação epitelial, núcleos aumentados contendo nucléolos evidentes, e áreas de perda de diferenciação citoplasmática (seta preenchida). Destaca-se ainda a densidade microvascular na periferia da lesão (setas vazadas). HE.**

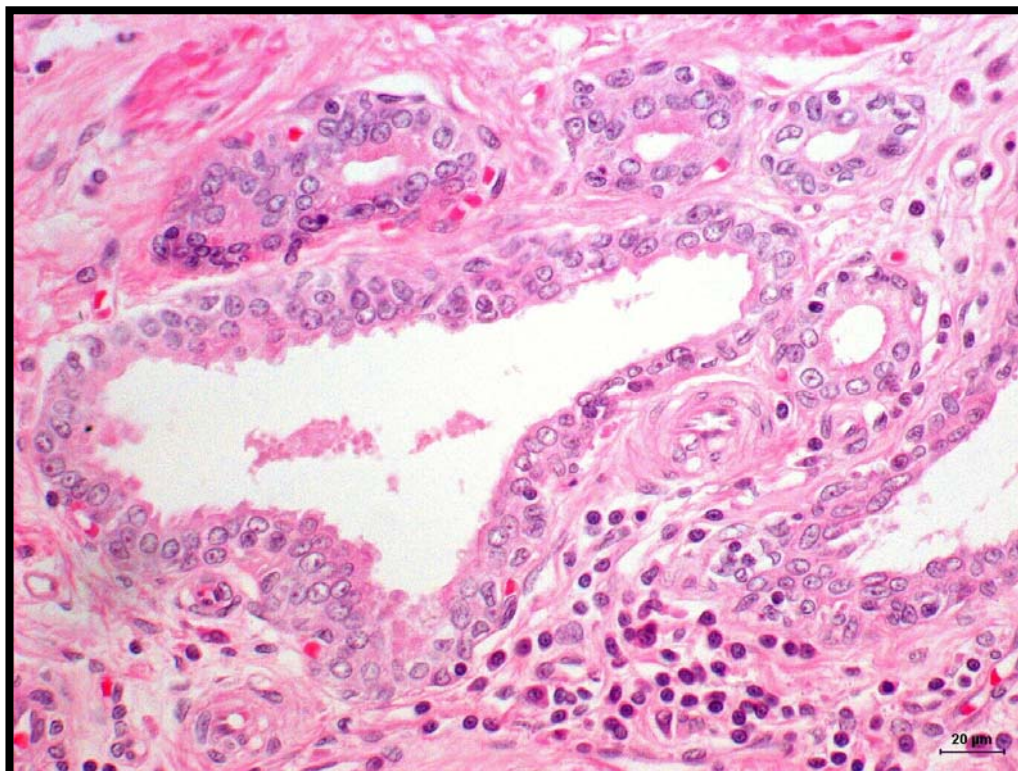


**Figura 6: Próstata canina. Focos de HGPIN onde se observam intensa estratificação epitelial, núcleos aumentados contendo nucléolos evidentes e perda de diferenciação citoplasmática. Em alguns segmentos nota-se tendência a crescimento cribriforme (setas). HE.**

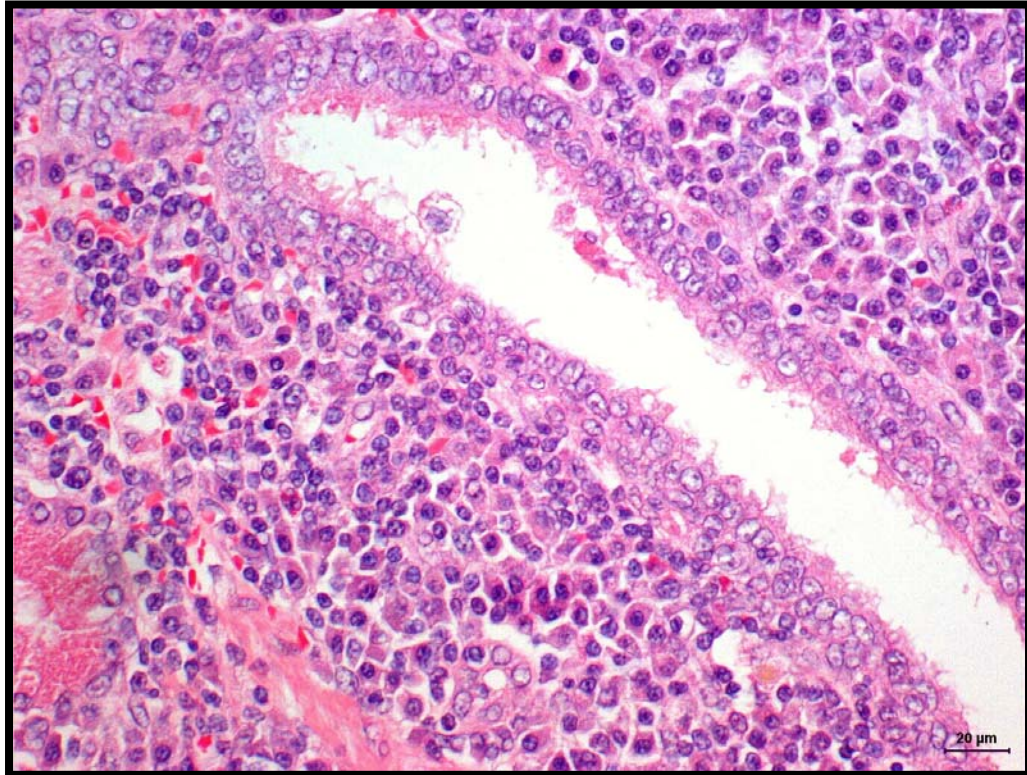
Observaram-se critérios diagnósticos para PIA em 56 amostras procedentes de 21 animais. A idade destes cães variou entre quatro anos e seis meses e doze anos. Dois deles apresentavam diagnóstico concomitante de adenocarcinoma prostático e os outros, em geral, HPB e prostatite como consta no Anexo C. Quanto à inflamação adjacente, 19 destes casos estavam associados à inflamação discreta (PIA-D), 20 à inflamação moderada (PIA-M) e 17 à inflamação intensa (PIA-I). Em todos os casos houve predomínio de infiltrado inflamatório mononuclear, porém polimorfonucleares foram também observados.

Nas Figuras 7, 8 e 9 observa-se o aspecto microscópico destas lesões, onde em geral notou-se diminuição de citoplasma tanto apical quanto lateral, o que gerou um aspecto de maior agregação nuclear e basofilia em menor aumento; perda de projeções papilares vascularizadas, formato acinar eventualmente irregular ou angular, aumento de volume nuclear e nucleolar em grau e frequência variáveis.

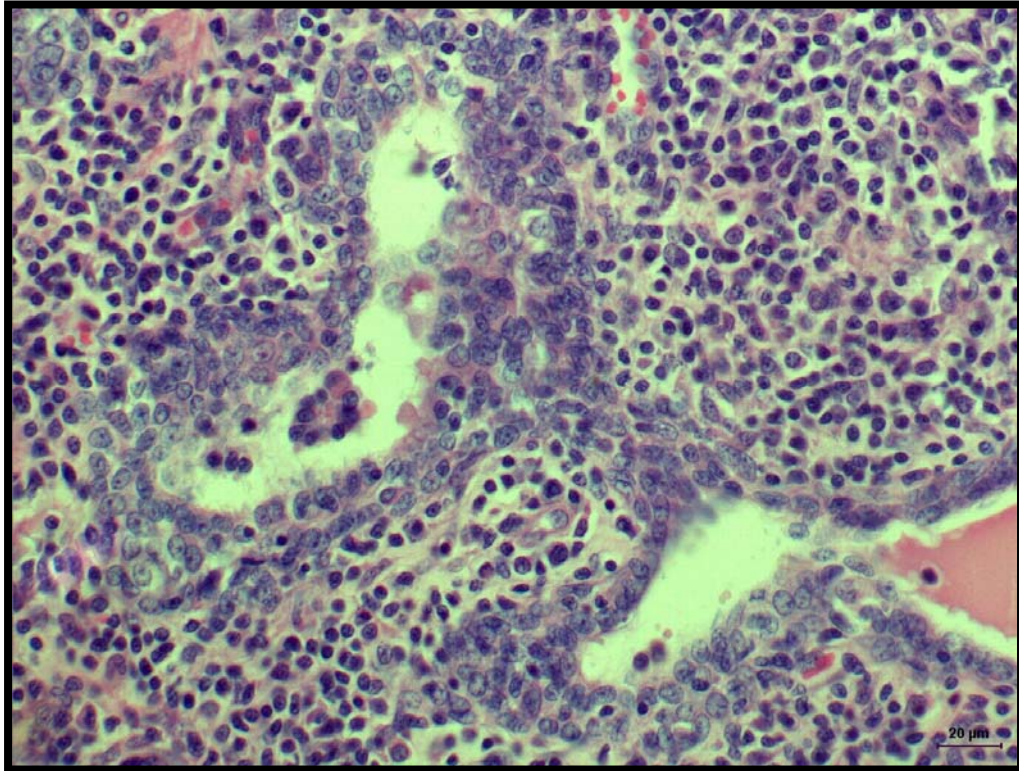
Tais lesões foram classificadas de acordo com a intensidade da inflamação adjacente aos focos atróficos, assim, considerou-se a inflamação discreta quando havia poucas células inflamatórias, espaçadas em sua maioria (Figura 7); moderada onde se observaram agregados de células inflamatórias sem destruição tecidual ou formação de folículos ou nódulos linfóides (Figura 8); e intensa quando existiam agregados confluentes de células inflamatórias com destruição tecidual ou formação de folículos ou nódulos linfóides (Figura 9).



***Figura 7: Próstata canina. Focos de PIA em associação à inflamação discreta. Observa-se pequeno número de células inflamatórias adjacentes aos ácinos, além de aumento do volume nuclear e nucleolar no epitélio secretor. HE.***



***Figura 8: Próstata canina. Foco de PIA em associação à inflamação moderada. Células inflamatórias predominantemente mononucleares são observadas formando um agregado volumoso ao redor do ácino. Notam-se ainda atipias epiteliais, como núcleos volumosos e nucléolos evidentes. HE.***



***Figura 9: Próstata canina. Focos de PIA em associação à inflamação intensa. Observa-se grande número de células inflamatórias confluindo na região circunvizinha aos ácinos e eventualmente no interior destes. O epitélio acinar apresenta aspecto proliferativo, núcleos volumosos, nucléolos evidentes e perda da diferenciação citoplasmática. HE.***

#### 4.2) Avaliação imunoistoquímica e de AgNOR

A marcação imunoistoquímica para o anticorpo PCNA foi quase exclusivamente de células basais em ácinos prostáticos normais (Figura 10), enquanto foi observada também no compartimento secretor dos ácinos com HGPIN e PIA independentemente do grau de inflamação (Figuras 11, 12, 13 e 14). Da mesma forma, o anticorpo Ki-67 também foi positivo em células secretoras nos casos de HGPIN e PIA (Figuras 15, 16, 17 e 18), enquanto raramente o era em ácinos normais (Figura 19), contudo o número de células marcadas para Ki-67 foi sempre menor que o observado com PCNA.

Quando comparados os percentuais de células marcadas para PCNA, o índice proliferativo foi significativamente maior em ácinos contendo HGPIN e PIA que nos normais, porém estes últimos não diferiram entre si. (Tabela 2). Resultado semelhante foi obtido quando comparamos ácinos normais, HGPIN e os três subgrupos de PIA (Tabela 3).

**Tabela 2: Índice proliferativo em ácinos normais, HGPIN e PIA de acordo com a marcação para o anticorpo PCNA.**

Classificação	Número de casos	Média (%) $\pm$ desvio padrão
Normal	10	8,60a $\pm$ 2,06
PIA	56	17,71b $\pm$ 5,71
HGPIN	8	21,75b $\pm$ 8,10

Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 3: Índice proliferativo em ácinos normais, HGPIN e nos diferentes subgrupos PIA de acordo com a marcação para o anticorpo PCNA.**

Classificação	Número de casos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	10	8,60a ± 2,06
PIA-D	19	16,74b ± 5,13
PIA-M	20	18,60b ± 6,52
PIA-I	17	17,76b ± 5,47
HGPIN	8	21,75b ± 8,10

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As mesmas análises foram realizadas nos resultados obtidos para o anticorpo Ki-67 e, considerando a análise geral, o grupo normal apresentou índice proliferativo significativamente menor que os grupos HGPIN e PIA, porém estes últimos não diferiram entre si. (Tabela 4). Diversamente, quando considerados os subgrupos de PIA, não foram observadas diferenças significativas (Tabela 5).

A despeito das diferenças numéricas, foi verificada correlação entre a marcação com os anticorpos PCNA e Ki-67 considerando a marcação obtida pelos dois anticorpos na mesma amostra (Tabela 6).

A Figura 20 ilustra os resultados obtidos para os dois anticorpos considerando as duas formas de análise: entre os grupos principais (normal, HGPIN e PIA), e entre o grupo normal, HGPIN e os subgrupos de PIA.

**Tabela 4: Índice proliferativo em ácinos normais, HGPIN e PIA de acordo com a marcação para o anticorpo Ki-67.**

Classificação	Número de casos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	10	1,50a ± 0,71
PIA	46	2,15b ± 1,60
HGPIN	5	3,40b ± 1,14

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**Tabela 5: Índice proliferativo em ácinos normais, HGPIN e nos diferentes subgrupos PIA de acordo com a marcação para o anticorpo Ki-67.**

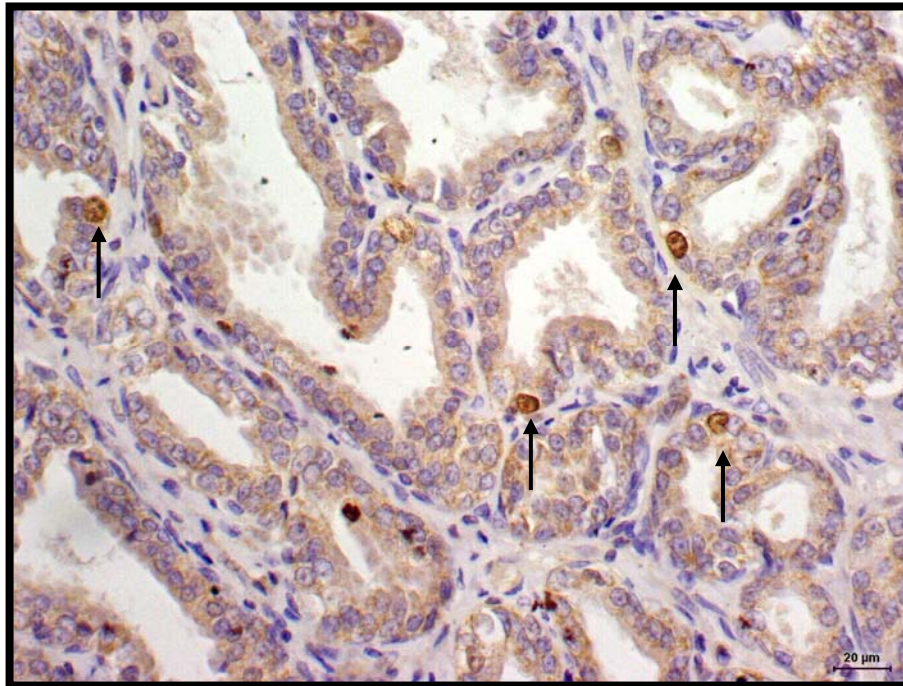
Classificação	Número de casos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	10	1,50a ± 0,71
PIA-D	17	1,65a ± 0,86
PIA-M	13	2,23a ± 1,30
PIA-I	16	2,62a ± 2,25
HGPIN	5	3,40a ± 1,14

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

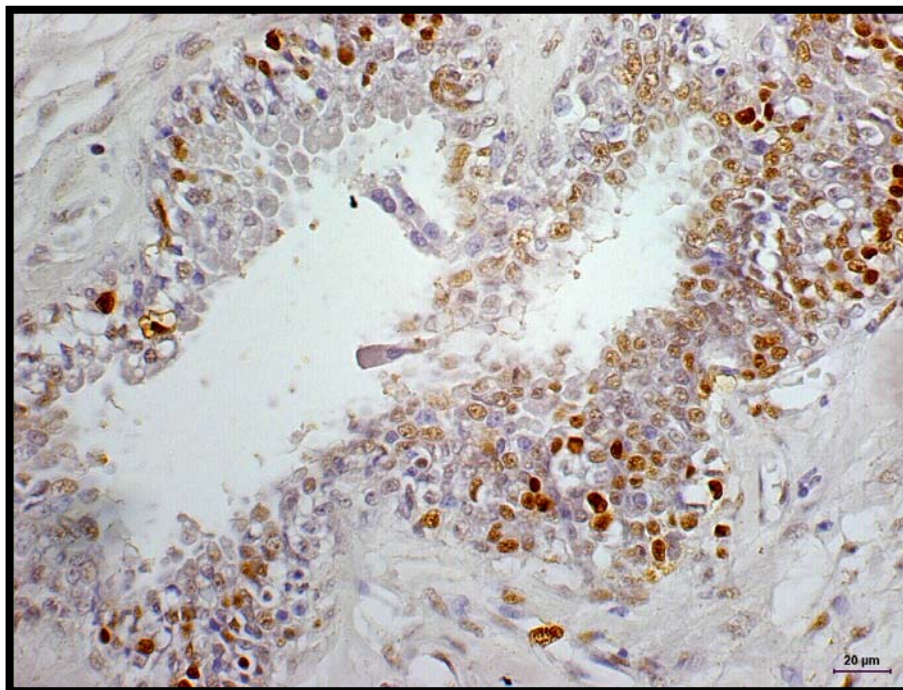
**Tabela 6: Correlação entre a marcação para os anticorpos PCNA e Ki-67.**

	Ki-67	PCNA
Ki-67	1.00000	0,75952*** (<.0001)
PCNA	0,75952*** (<.0001)	1.00000

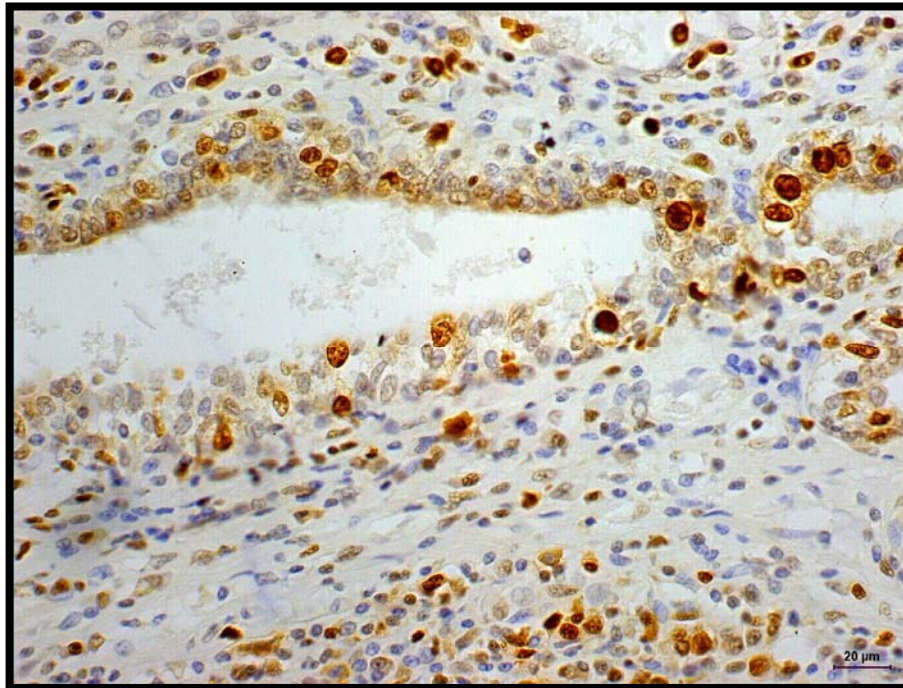
Valores seguidos por\*\*\*, são significativos pelo coeficiente de correlação de Pearson.



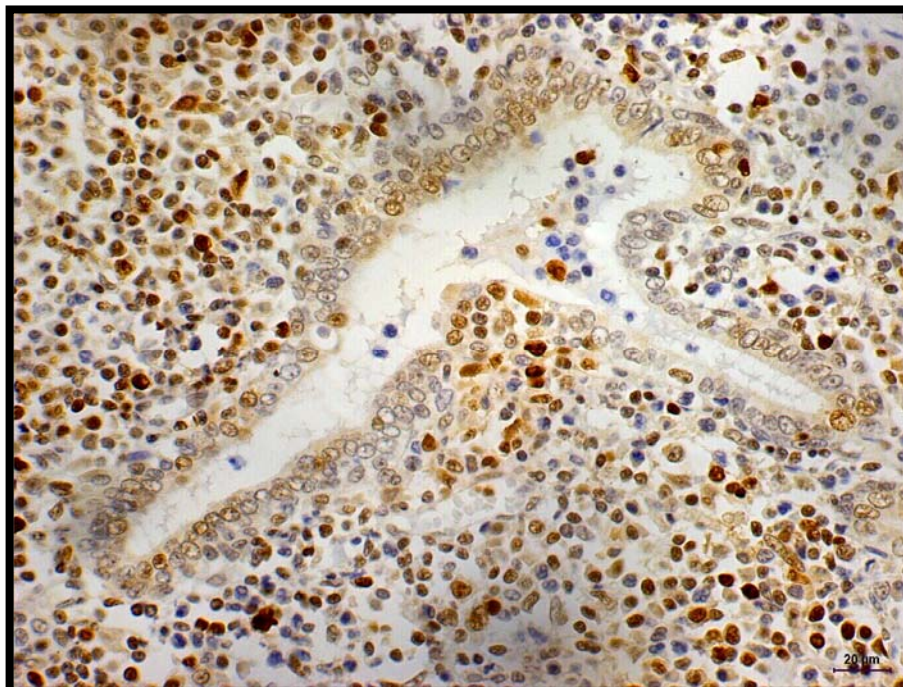
**Figura 10: Próstata canina. Glândula normal com marcação positiva em núcleos de células basais para o anticorpo PCNA (setas). Imunoperoxidase, DAB.**



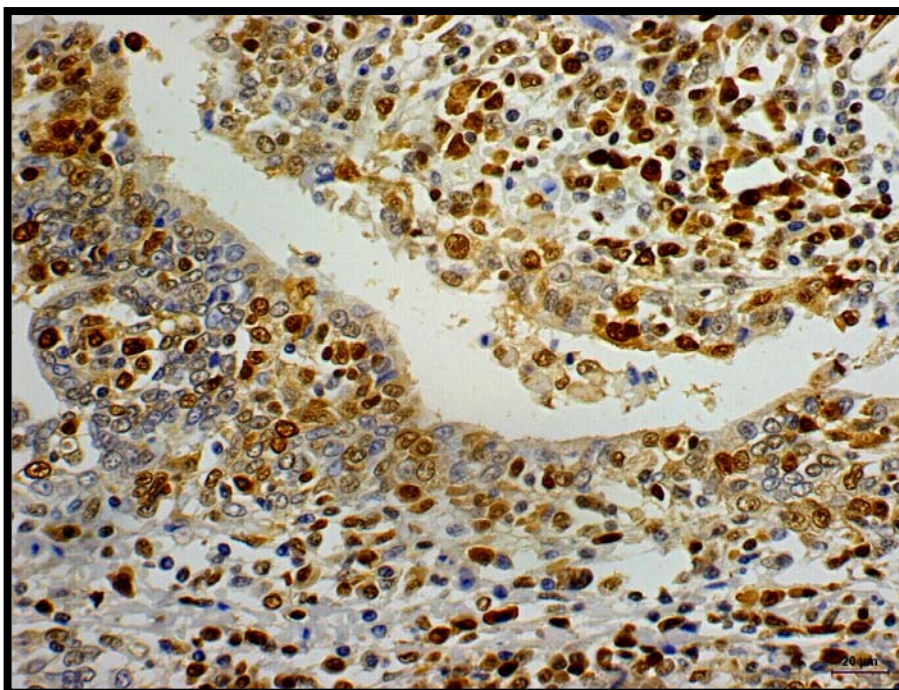
**Figura 11: Próstata canina. Foco de HGPIN com destaque à marcação nuclear de células basais e secretoras. PCNA, imunoperoxidase, DAB.**



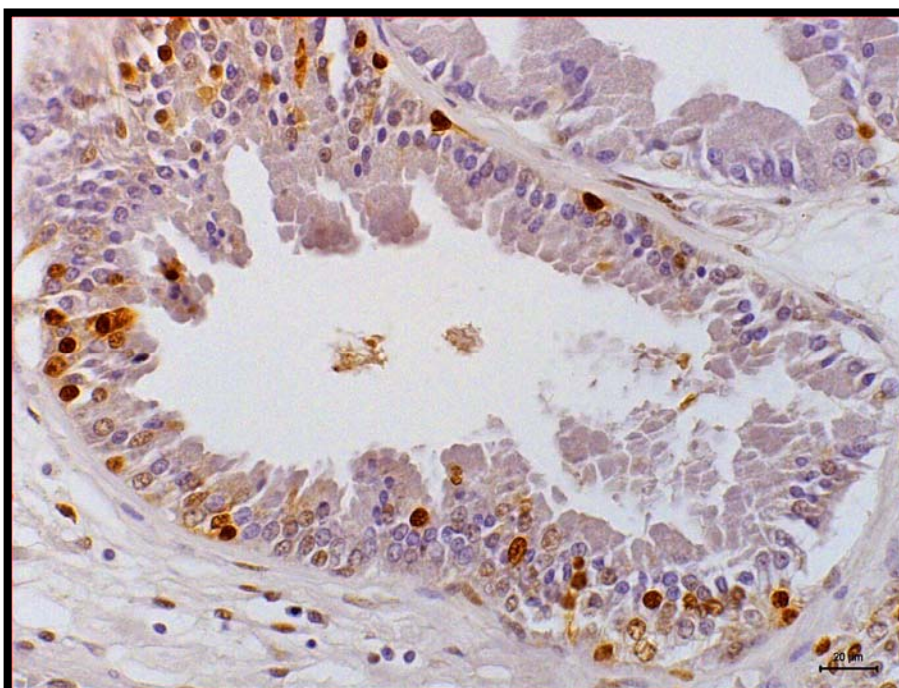
**Figura 12: Próstata canina. Focos de PIA associada a infiltrado inflamatório discreto com positividade em núcleos de células basais e secretoras, além de algumas células inflamatórias do estroma adjacente. PCNA, imunoperoxidase, DAB.**



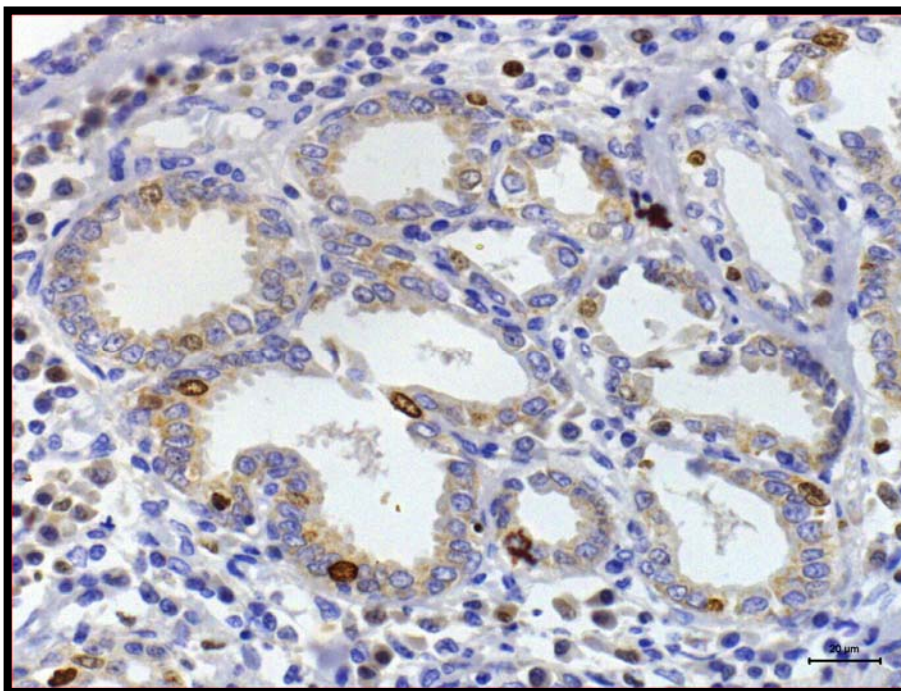
**Figura 13: Próstata canina. Foco de PIA associada à inflamação moderada com marcação nuclear predominante em células epiteliais secretoras. PCNA, imunoperoxidase, DAB.**



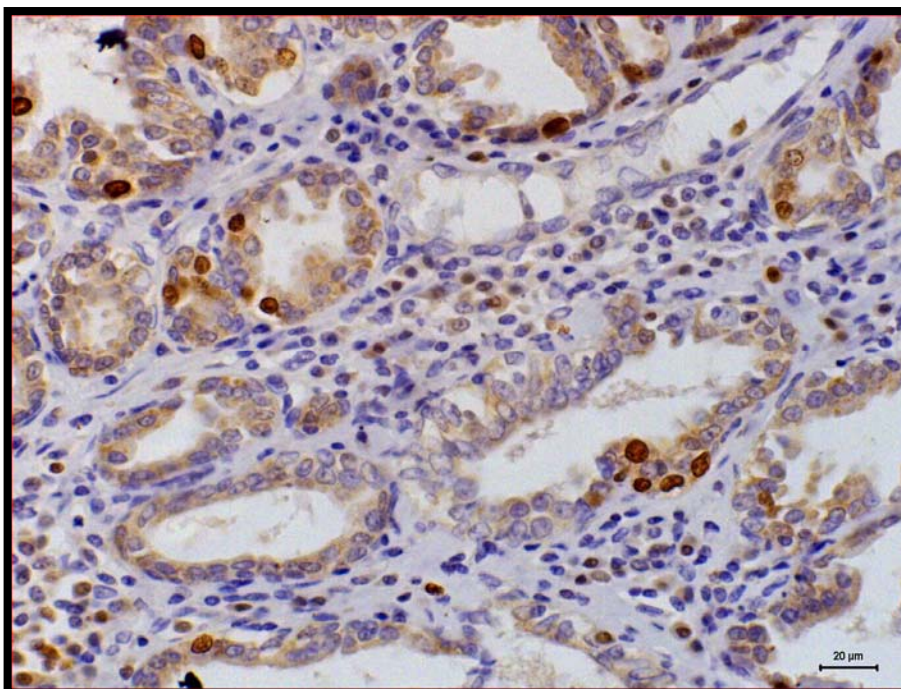
**Figura 14: Próstata canina. Foco de PIA acompanhada de intenso infiltrado inflamatório periglandular e intra-epitelial, com imunomarcção positiva em núcleos de células epiteliais basais e secretoras. PCNA, imunoperoxidase, DAB.**



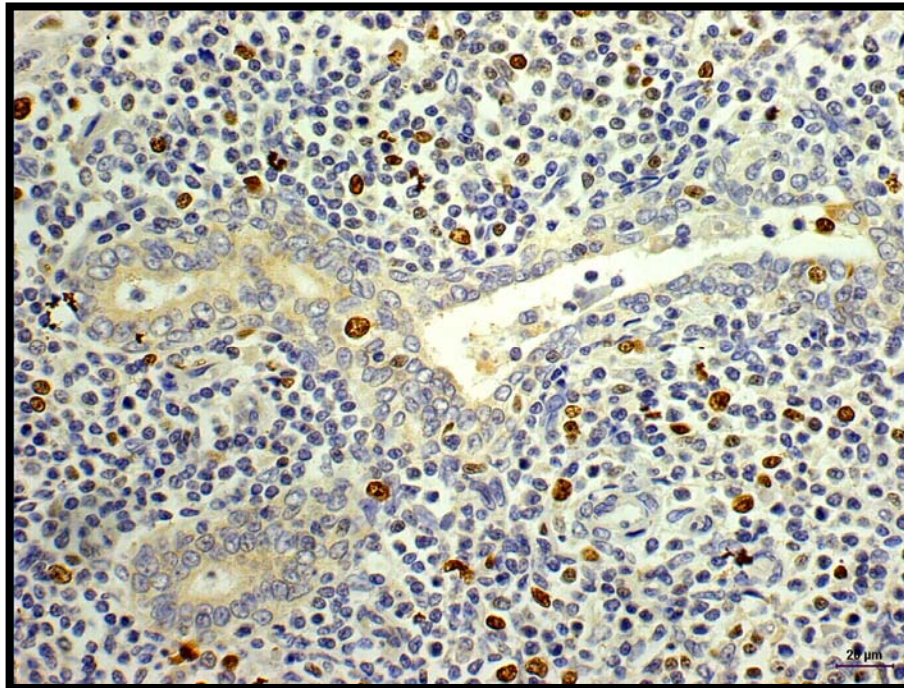
**Figura 15: Próstata canina. Foco de HGPIN com destaque à marcação nuclear de células basais e secretoras. Ki-67, imunoperoxidase, DAB.**



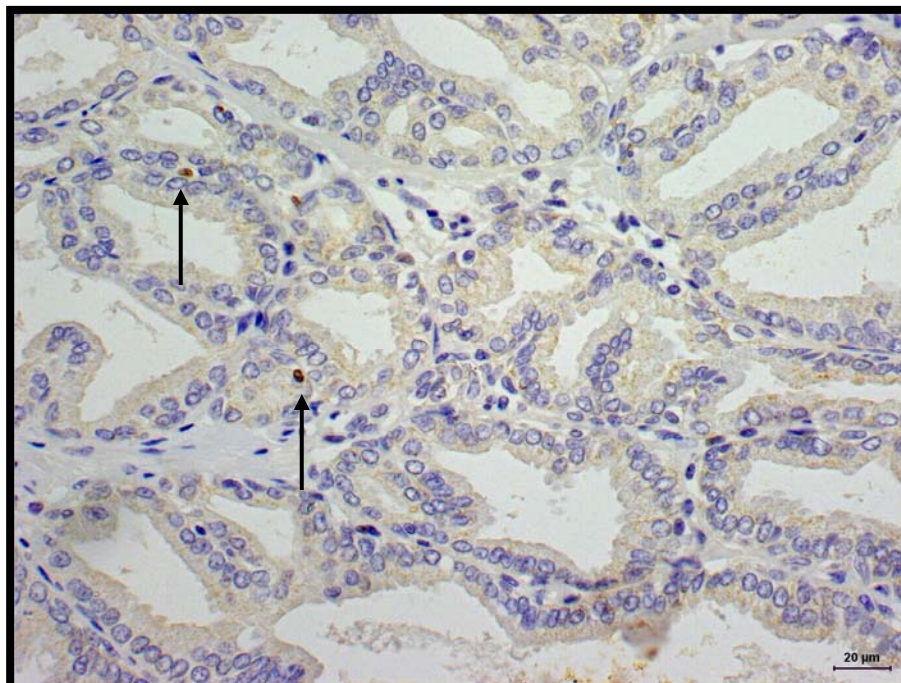
**Figura 16: Próstata canina. Focos de PIA associada a infiltrado inflamatório discreto com raros núcleos de células basais e secretoras positivas. Ki-67, imunoperoxidase, DAB.**



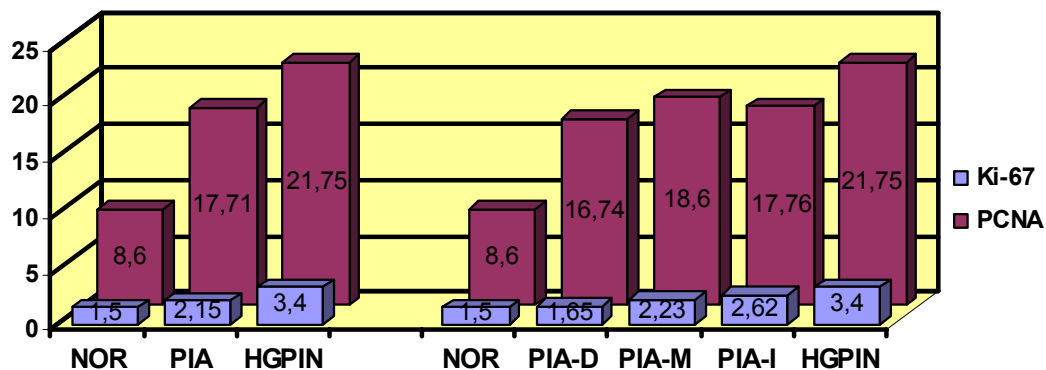
**Figura 17: Próstata canina. Focos de PIA associados à inflamação moderada com marcação nuclear em células epiteliais basais e secretoras. Ki-67, imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 18: Próstata canina. Focos de PIA-I com imunomarcção positiva em núcleos de células epiteliais basais e secretoras, além de células inflamatórias adjacentes. Ki-67, imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 19: Próstata canina. Glândula normal com imunomarcção nuclear positiva o anticorpo Ki-67 em raras células basais (setas). Imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 20: Índice proliferativo resultante da marcação para os anticorpos Ki-67 e PCNA em próstatas normais (NOR), HGPIN e PIA, de modo geral e considerando os subgrupos.**

Quanto ao anticorpo caspase-3, o índice apoptótico do grupo HGPIN foi maior que os observados nos grupos normal e PIA, quando este último foi avaliado como um todo. Quando se consideraram os subgrupos de PIA, os resultados não diferiram estatisticamente entre si (Tabelas 7 e 8). A imunoreatividade foi sempre quantitativamente muito baixa e com marcação de intensidade moderada (Figuras 21 e 22).

**Tabela 7: Índice apoptótico em ácinos normais, HGPIN e PIA, de acordo com a marcação para o anticorpo caspase 3.**

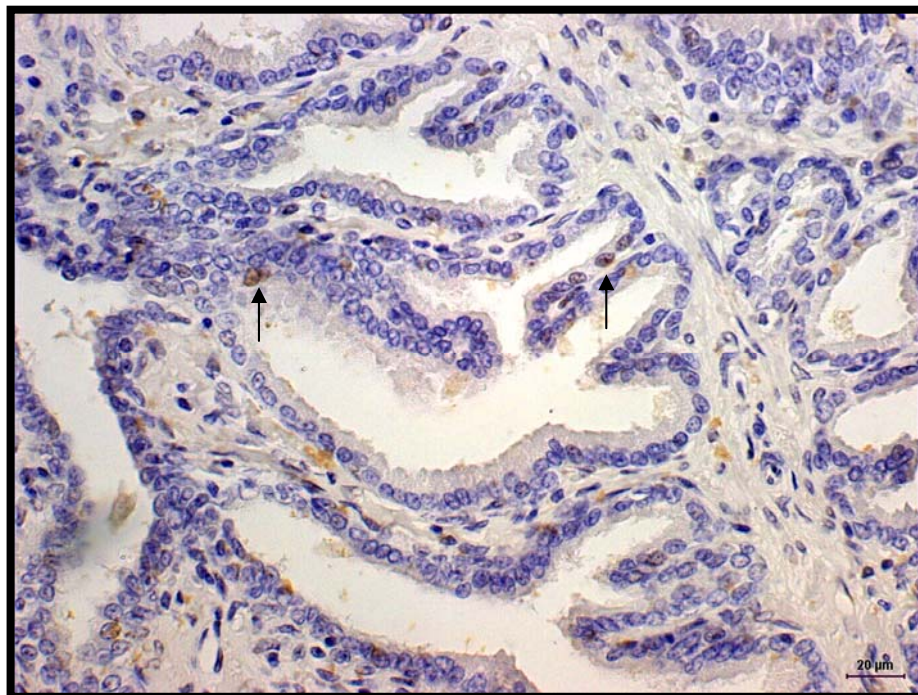
Classificação	Número de casos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	10	0,60a ± 0,70
PIA	56	1,02ab ± 0,92
HGPIN	8	1,62b ± 0,74

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

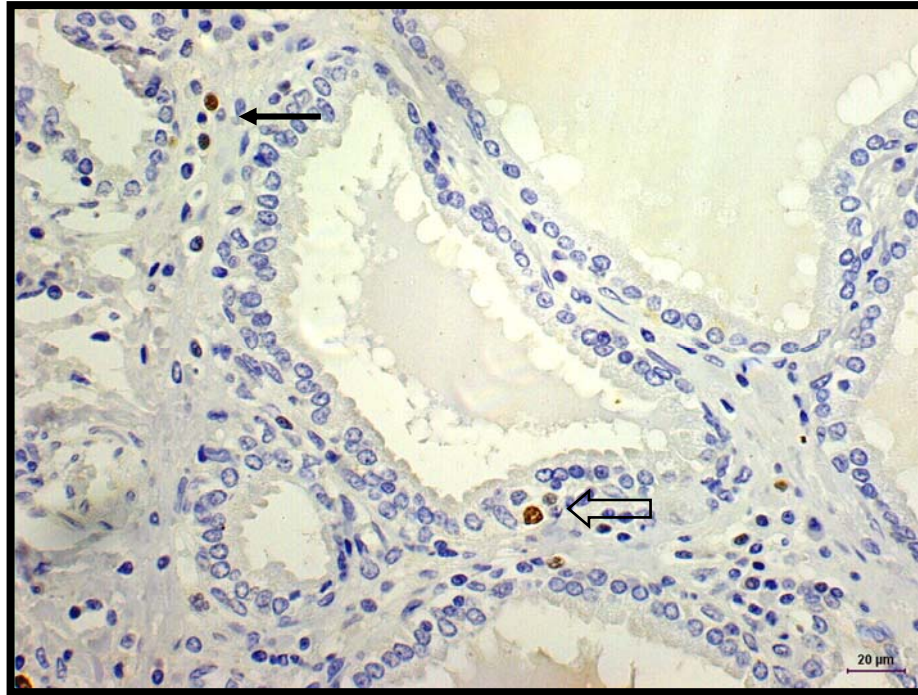
**Tabela 8: Índice apoptótico em ácinos normais, HGPIN e nos diferentes subgrupos PIA de acordo com a marcação para o anticorpo caspase 3.**

Classificação	Número de casos	Média (%) $\pm$ desvio padrão
Normal	10	0,60a $\pm$ 0,70
PIA-D	19	1,00a $\pm$ 0,82
PIA-M	20	1,20a $\pm$ 1,06
PIA-I	17	0,82a $\pm$ 0,88
HGPIN	8	1,62a $\pm$ 0,74

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

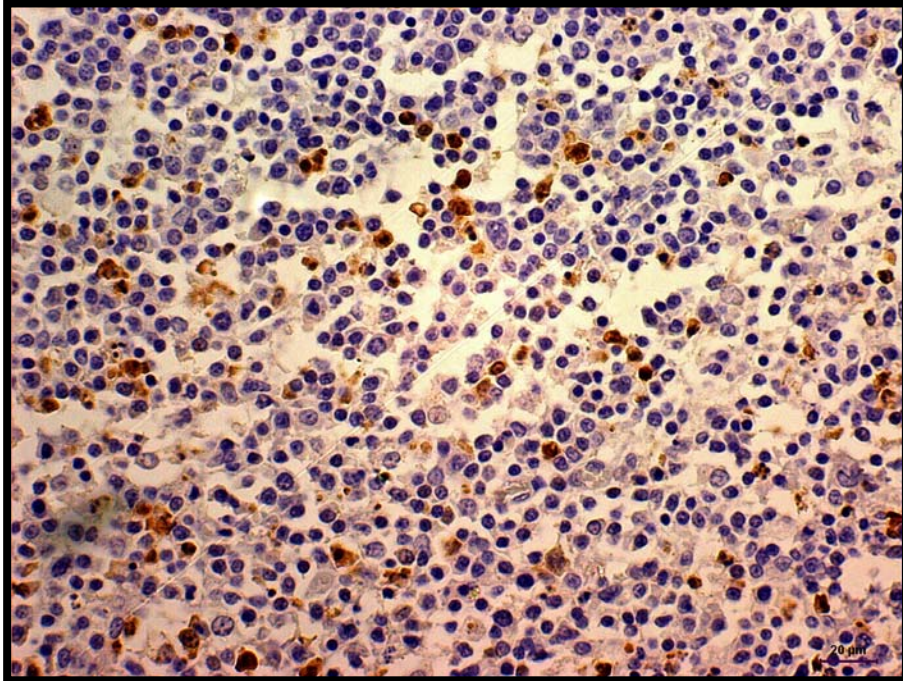


**Figura 21: Próstata canina. Ácinos normais exibindo raras células marcadas para caspase 3 (setas). Immunoperoxidase, DAB.**

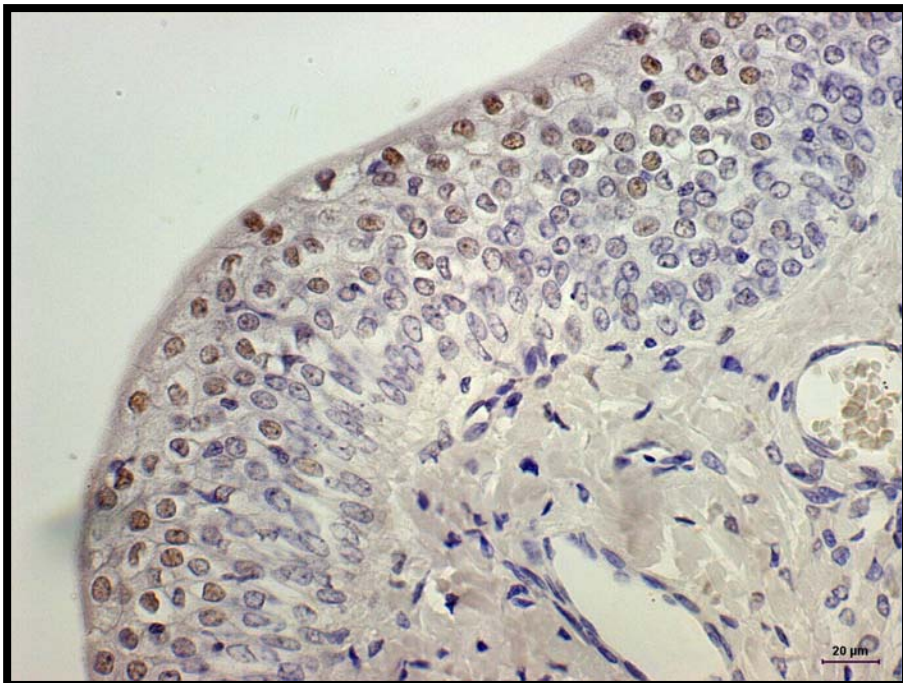


**Figura 22: Próstata canina. Ácinos contendo PIA mostram marcação positiva para caspase 3 em apenas uma célula acinar (seta vazada) e em raras células inflamatórias do estroma (seta cheia). Immunoperoxidase, DAB.**

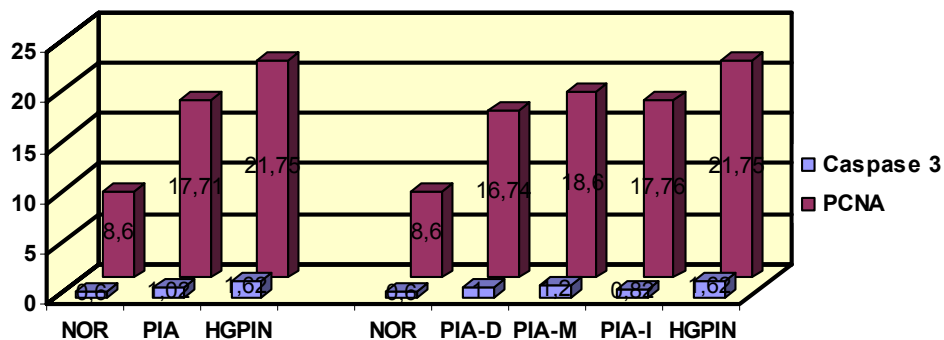
Em diversos focos avaliados não houve uma única célula marcada, porém a padronização prévia do anticorpo em tonsila canina trouxe bons resultados (Figura 23), e a marcação do epitélio superficial da uretra prostática no material estudado forneceu sempre um controle positivo interno, o que nos permitiu confiar na acurácia da técnica (Figura 24). A relação entre índice proliferativo e índice apoptótico pode ser melhor observada na Figura 25, considerando a marcação para o anticorpo PCNA que pôde ser utilizado em todas as amostras.



**Figura 23: Tonsila canina. Marcação de um grande número de células em apoptose, controle positivo para o anticorpo caspase 3 em tecido canino. Immunoperoxidase, DAB.**



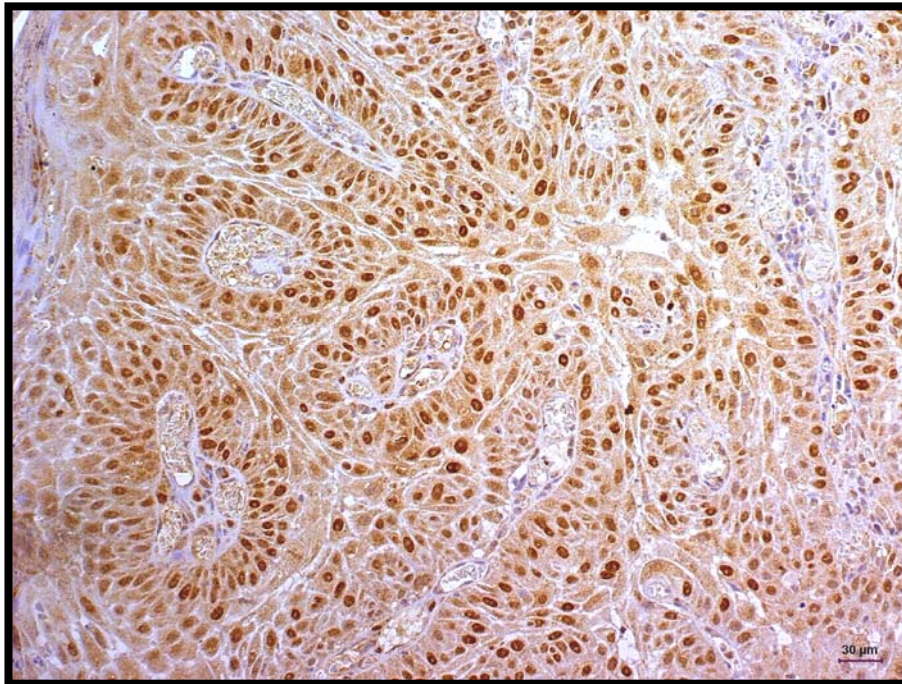
**Figura 24: Próstata canina; uretra prostática. Observam-se células marcadas nas camadas epiteliais superficiais fornecendo um controle positivo interno para o anticorpo. Immunoperoxidase, caspase 3, 40x.**



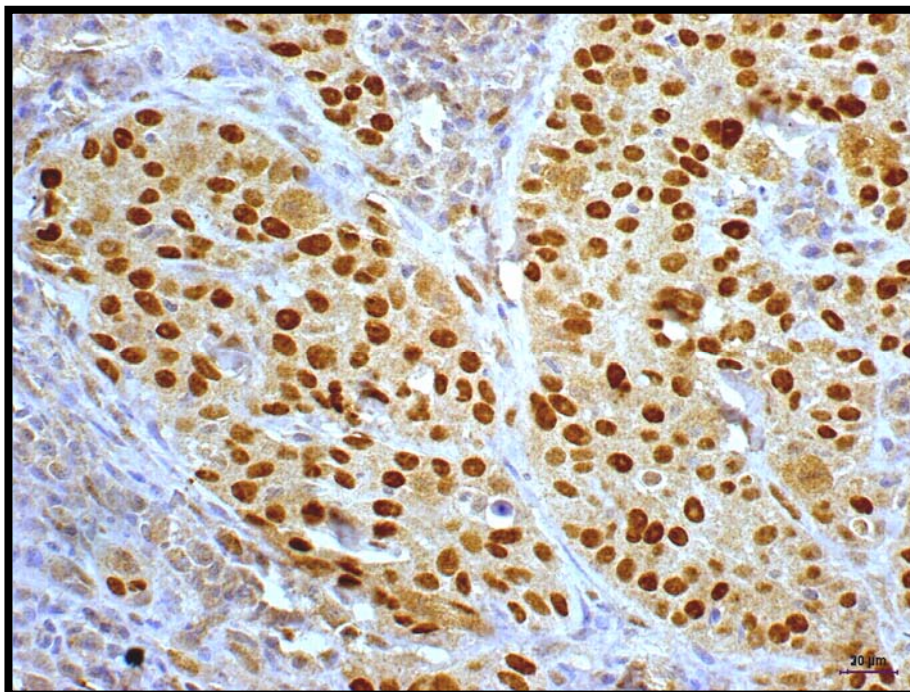
**Figura 25: Índices proliferativos (PCNA) e apoptóticos (caspase 3) obtidos em próstatas normais (NOR), HGPIN e PIA, de modo geral e considerando os subgrupos.**

Da mesma forma, inicialmente foi preocupante a ausência de imunoreatividade para o anticorpo p-53, pois como não contávamos com um controle positivo canino, não poderíamos estar certos de que o material era negativo. Após termos obtido um fragmento de carcinoma de células escamosas canino p-53 positivo (Figuras 26 e 27), realmente foi constatada a negatividade tanto de ácinos normais, o que já era esperado, quanto de ácinos contendo HGPIN e PIA.

Quanto ao anticorpo bcl-2, não foi possível neste estudo a padronização em tecido canino fixado em formol e incluído em parafina, não sendo, portanto, aplicado nas amostras avaliadas.



**Figura 26: Carcinoma de células escamosas na pele de um cão. Observa-se marcação nuclear fortemente positiva nas ilhas de células neoplásicas. p-53, Imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 27: Caso anterior em maior aumento. Notam-se núcleos especificamente marcados, embora haja coloração de “fundo” discreta no estroma. p-53, Imunoperoxidase, DAB.**

A avaliação do padrão de imunoreatividade para o anticorpo E-caderina revelou que a expressão dessas moléculas de adesão celular foi mais intensa e homogênea em glândulas normais que nos casos de HGPIN e PIA, porém estes não diferiram entre si. Quando avaliados os diferentes subgrupos de PIA, focos de HGPIN apresentaram expressão significativamente menos intensa e mais heterogênea que os casos de PIA associada à inflamação discreta, contudo todos diferiram de glândulas normais (Tabelas 9 e 10). Ácinos normais apresentaram sempre marcação forte e homogênea, enquanto aqueles com HGPIN e PIA obtiveram marcação em menor intensidade e/ou com maior heterogeneidade na maioria dos casos (Figuras 28, 29, 30 e 31).

**Tabela 9: Padrão de imunoreatividade para E-caderina em ácinos normais, HGPIN e PIA.**

Classificação	Número de casos	Médias Ordenadas
Normal	10	65,00a
PIA	56	34,73b
HGPIN	8	22,20b

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,0001$ ).

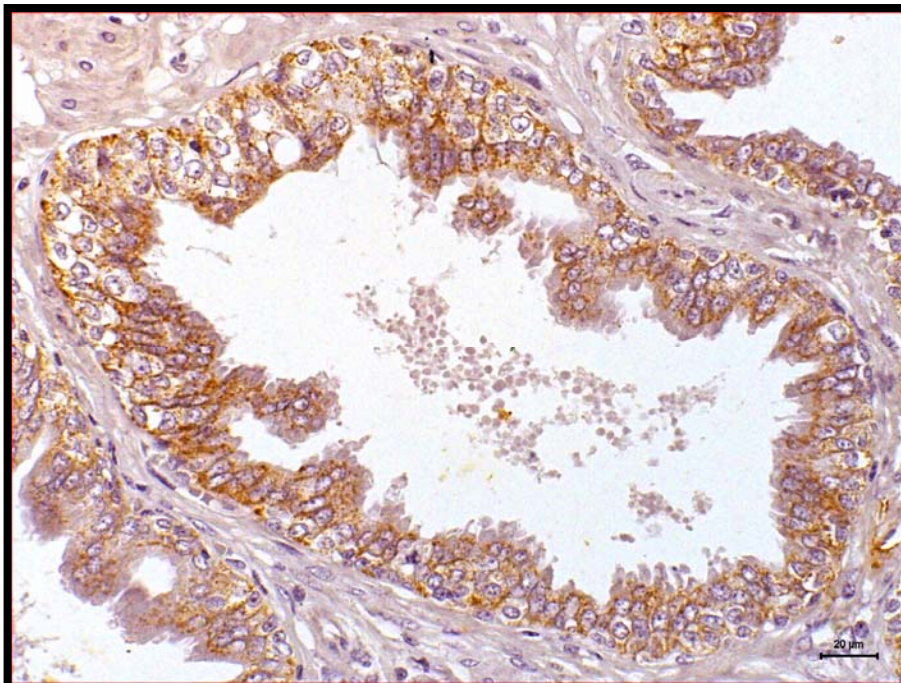
**Tabela 10: Padrão de imunoreatividade para E-caderina em ácinos normais, LGPIN e HGPIN.**

Classificação	Número de casos	Médias Ordenadas
Normal	10	65,00a
PIA-D	19	45,73b
PIA-M	20	34,57bc
PIA-I	17	22,62c
HGPIN	8	22,50c

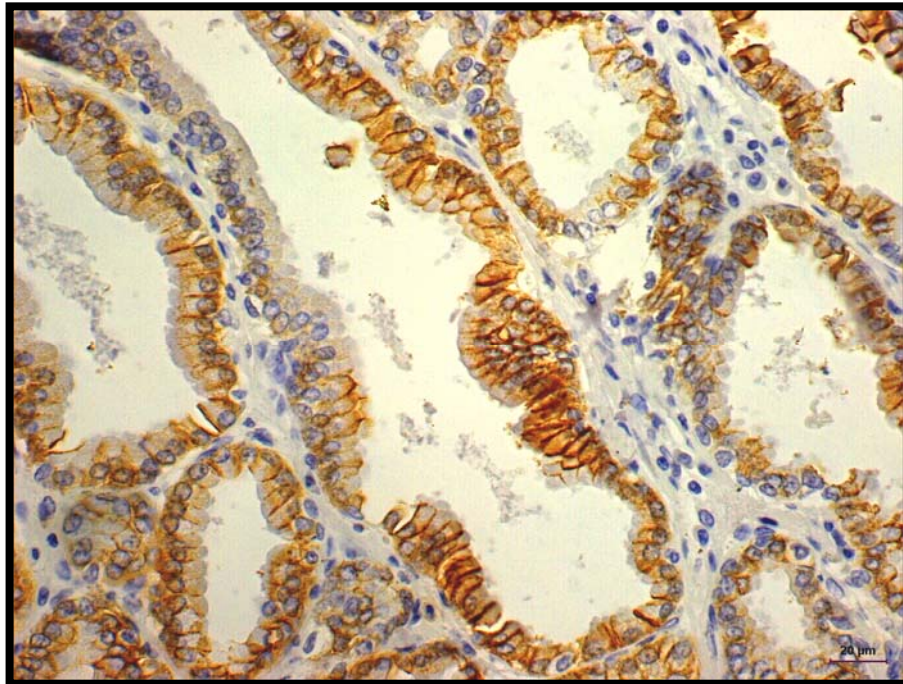
Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes, diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,0001$ ).



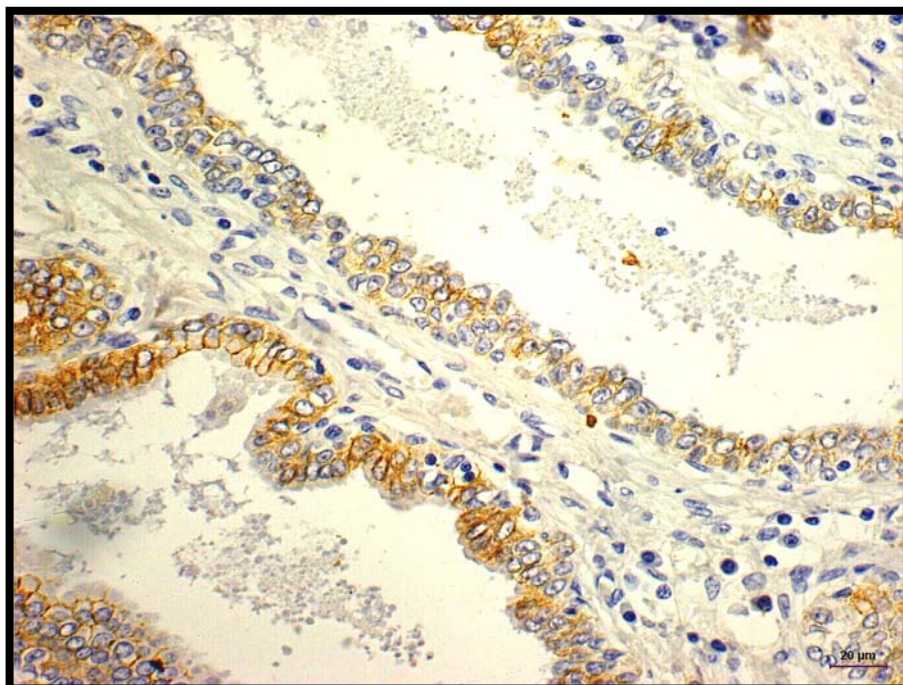
**Figura 28: Próstata canina. Ácino normal exibindo marcação forte e homogênea para E-caderina nas junções célula-célula em todo o epitélio secretor, correspondente ao escore “4”. Imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 29: Próstata canina. Ácinos contendo HGPIN com marcação fraca e homogênea para E-caderina, correspondendo ao escore “2”. Imunoperoxidase, DAB.**

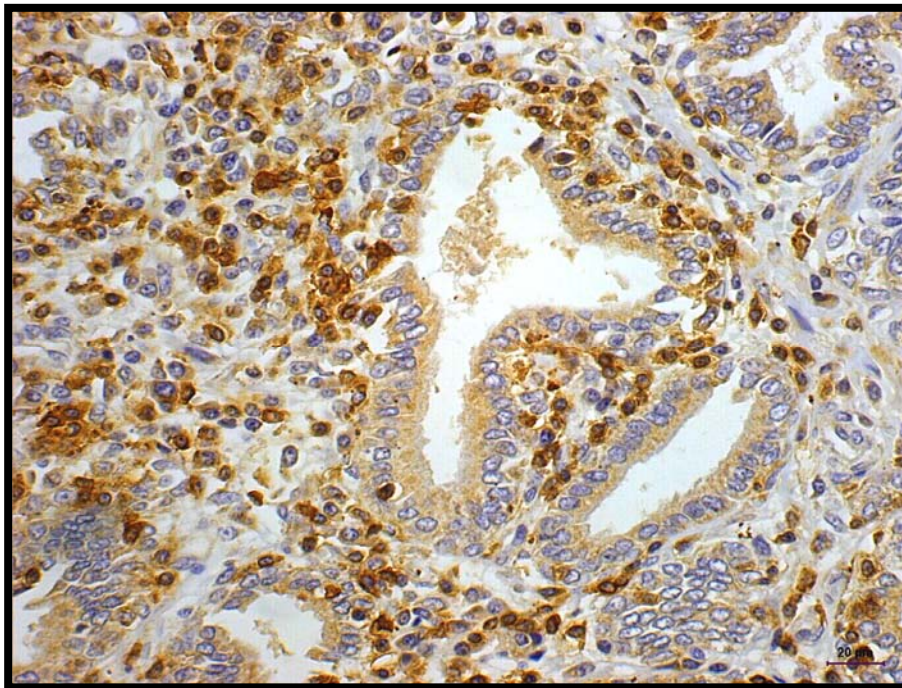


**Figura 30: Próstata canina. Ácino contendo PIA com marcação de intensidade forte, mas heterogênea para E-caderina no compartimento secretor, correspondendo ao escore “3”. Imunoperoxidase, DAB.**

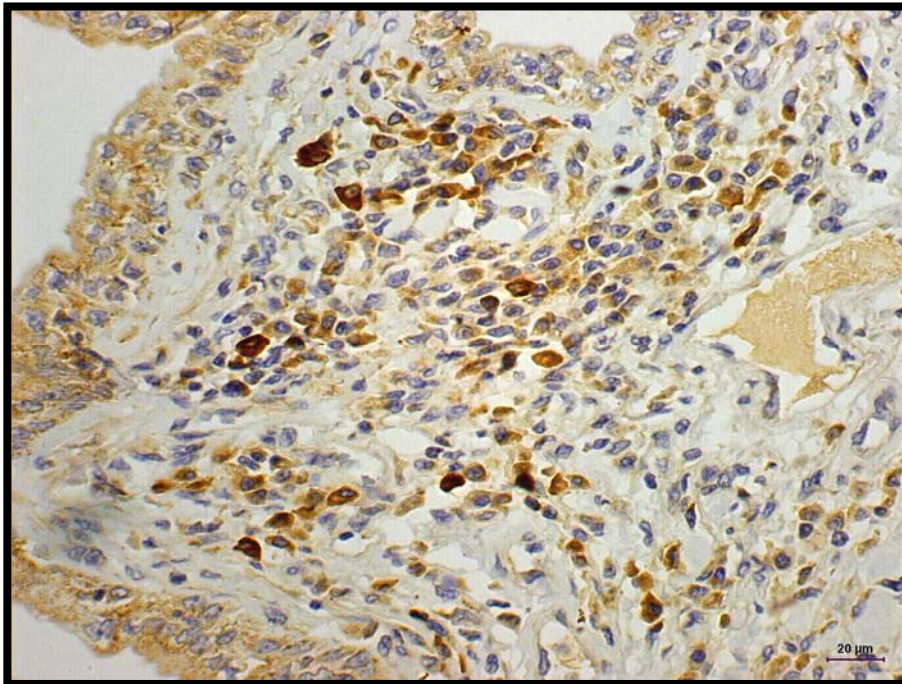


**Figura 31: Próstata canina. Ácinos contendo PIA com marcação fraca a moderada e heterogênea para E-caderina, correspondendo ao escore “1”. Imunoperoxidase, DAB.**

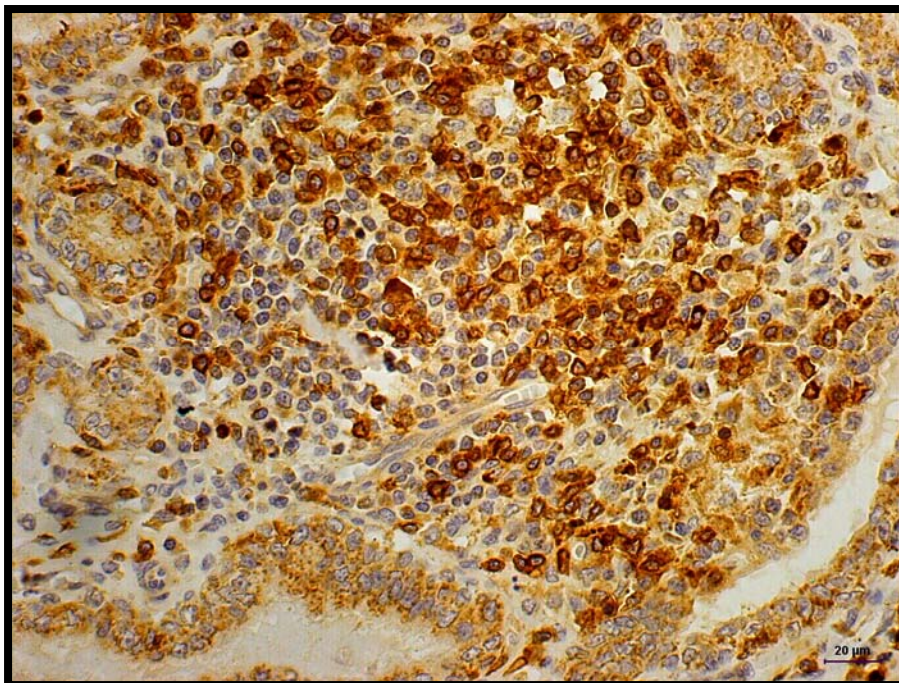
Quanto à imunofenotipagem do infiltrado inflamatório periglandular nas áreas de PIA (Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37), observou-se predomínio significativo de linfócitos T (CD3 positivos) em todos os casos, embora linfócitos B (CD79a positivos) tenham se mantido sempre presentes em menor proporção, independentemente da classificação considerada (Tabela 11). Três amostras tiveram percentual de marcação menor que 50% para CD3 e cinco apresentaram percentual maior que 50% para CD79a nos casos estudados.



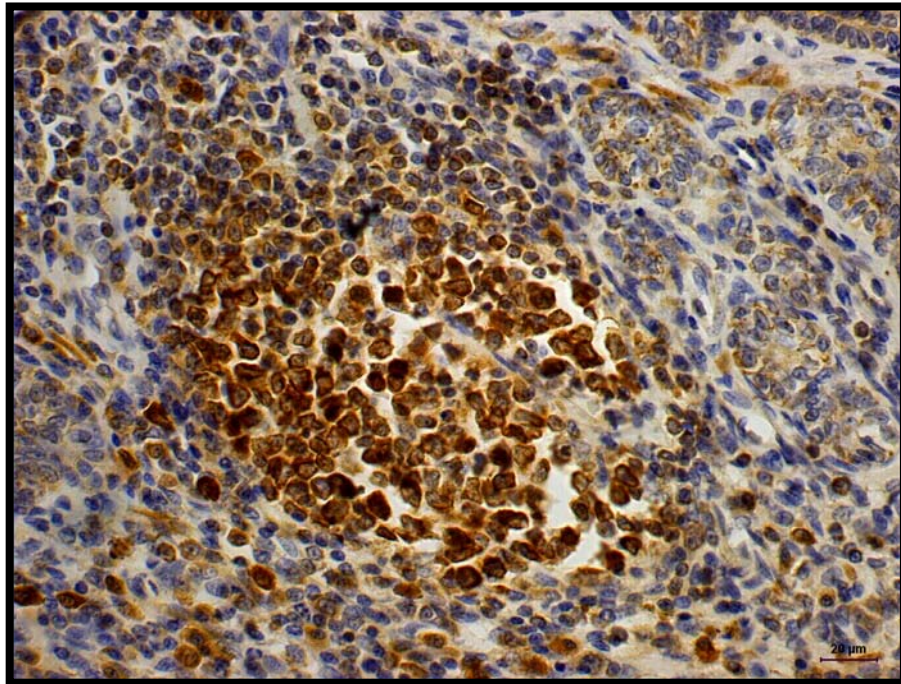
**Figura 32: Próstata canina. Focos de PIA-M contendo Infiltrado inflamatório mononuclear com marcação positiva de linfócitos T para o anticorpo CD-3. Imunoperoxidase, DAB.**



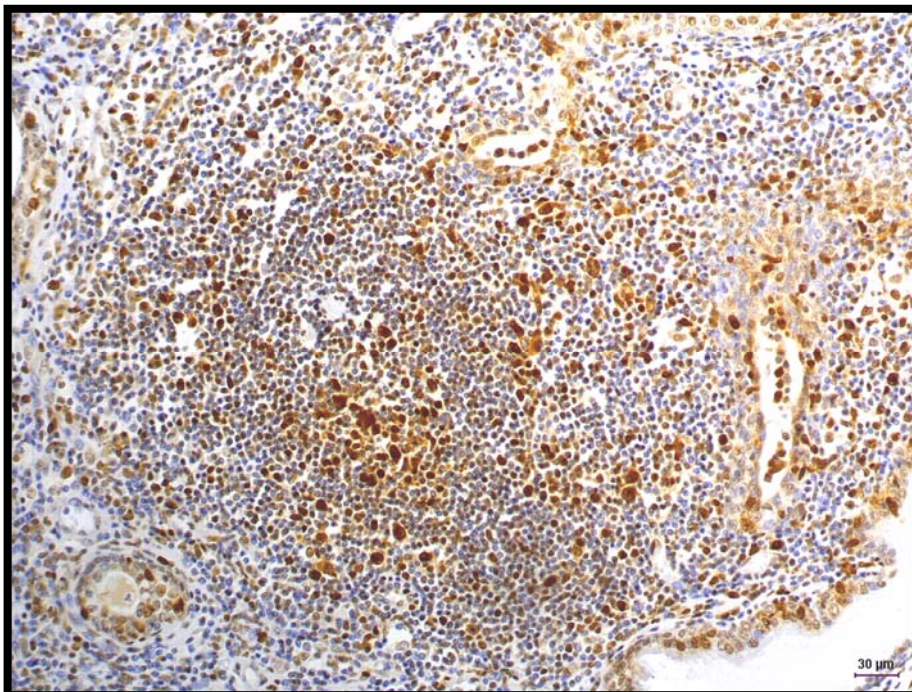
**Figura 33: Próstata canina. Focos de PIA-M contendo Infiltrado inflamatório mononuclear com marcação positiva de linfócitos B para o anticorpo CD79a. Imunoperoxidase, DAB.**



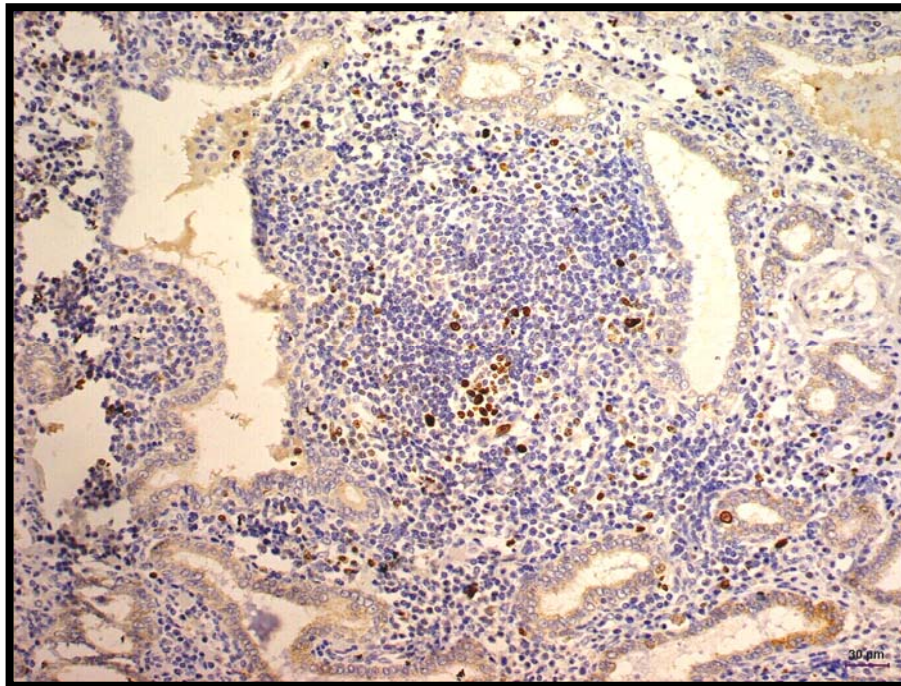
**Figura 34: Próstata canina. Focos de PIA-I com Infiltrado inflamatório mononuclear com marcação de linfócitos T para o anticorpo CD-3.**



**Figura 35: Próstata canina. Focos de PIA-I com Infiltrado inflamatório mononuclear com marcação de linfócitos B para o anticorpo CD79a. Observar a tendência à formação de folículos linfóides nesta região. Imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 36: Próstata canina. Focos de PIA-I marcados para o anticorpo PCNA, com destaque à proliferação de células inflamatórias na periferia dos ácinos. Imunoperoxidase, DAB.**



**Figura 37: Próstata canina. Focos de PIA-I marcados para o anticorpo KI-67, ressaltando a proliferação de células inflamatórias adjacentes aos ácinos. Immunoperoxidase, DAB.**

**Tabela 11: Ocorrência de linfócitos T e B em ácinos contendo PIA de modo geral e nos subgrupos avaliados, de acordo com a marcação para os anticorpos CD3 e CD79a, respectivamente.**

	PIA Geral	PIA-D	PIA-M	PIA-I
<b>CD3+</b>	*66,41 ± 9,74 a	*64,00 ± 12,80a	*68,60 ± 7,03 a	*66,53 ± 8,40a
<b>CD79a+</b>	*32,55 ± 8,77 b	*35,47 ± 10,89 b	*30,05 ± 7,56 b	*32,23 ± 6,73b

\*Média ± Desvio Padrão. Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A contagem de NOR's por núcleo revelou diferenças significativas entre núcleos de células normais e aquelas que compunham os focos de HGPIN e PIA, embora entre estas não tenha havido diferenças estatísticas (Tabelas 12 e 13). Ácinos normais obtiveram os menores valores, aumentando progressivamente nos grupos PIA e HGPIN.

**Tabela 12: Média de NOR's por núcleo em ácinos normais, PIA e HGPIN.**

Classificação	Número de núcleos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	1000	1,03a ± 0,52
PIA	5600	1,37b ± 0,76
HGPIN	800	1,45b ± 0,82

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

**Tabela 13: Média de NOR's por núcleo em ácinos normais, PIA em seus diferentes subgrupos e HGPIN.**

Classificação	Número de núcleos	Média (%) ± desvio padrão
Normal	1000	1,03a ± 0,52
PIA-D	1900	1,37b ± 0,77
PIA-M	2000	1,37b ± 0,76
PIA-I	1700	1,38b ± 0,75
HGPIN	800	1,45b ± 0,82

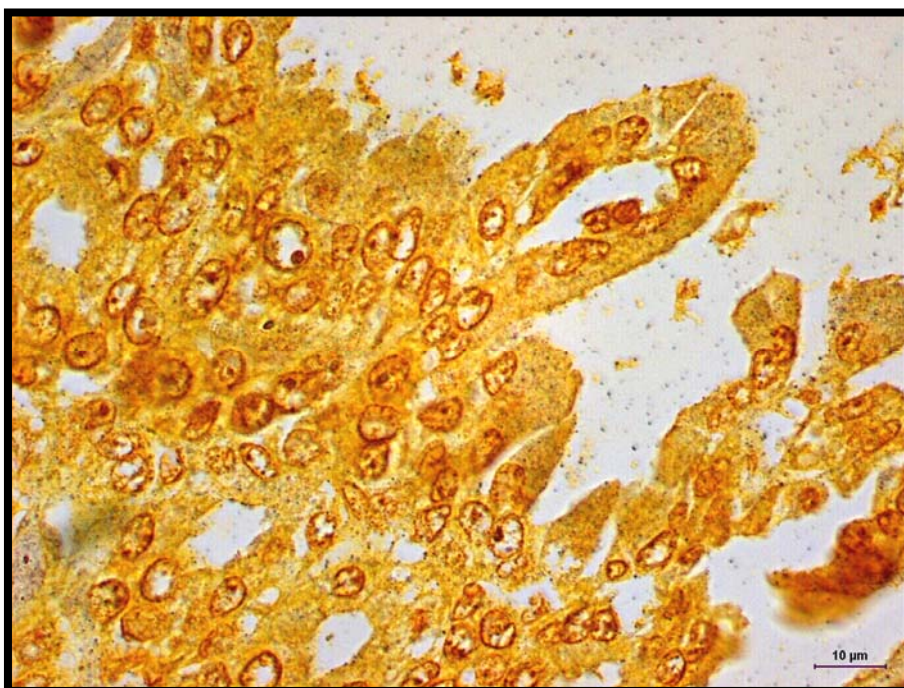
Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Quanto ao perfil proliferativo avaliado pela coloração de AgNOR, constatou-se que 100% dos casos estudados, inclusive os ácinos normais, apresentaram predomínio de NOR's agregadas, compondo uma estrutura solitária, correspondendo ao nucléolo. NOR's individualizadas compondo um mesmo nucléolo e pequenas NOR's dispersas foram observadas em diversos núcleos, porém nunca como padrão predominante (Figuras 38, 39, 40 e 41).

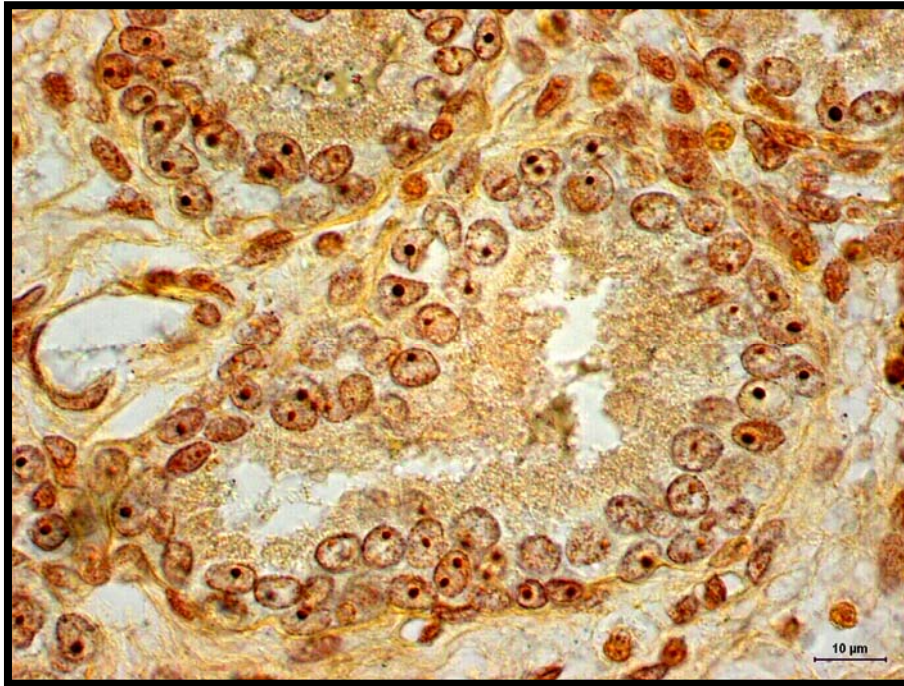
Os resultados individuais da avaliação imunoistoquímica e da contagem de AgNOR's de cada variável estudada encontram-se dispostos no Anexo C.



**Figura 38: Próstata canina. Ácinos normais exibindo marcação de uma ou duas pequenas NOR's, de coloração castanho-escuro, no interior de alguns dos núcleos. AgNOR.**



**Figura 39: Próstata canina. Marcação de pequenas e grandes NOR's, por vezes múltiplas no interior dos núcleos de ácinos contendo HGPIN. Observar que o volume das regiões marcadas é maior que dos ácinos normais da figura anterior. AgNOR.**



**Figura 40: Próstata canina. Marcação de pequenas e grandes NOR's, por vezes múltiplas no interior dos núcleos de ácinos contendo PIA. AgNOR.**



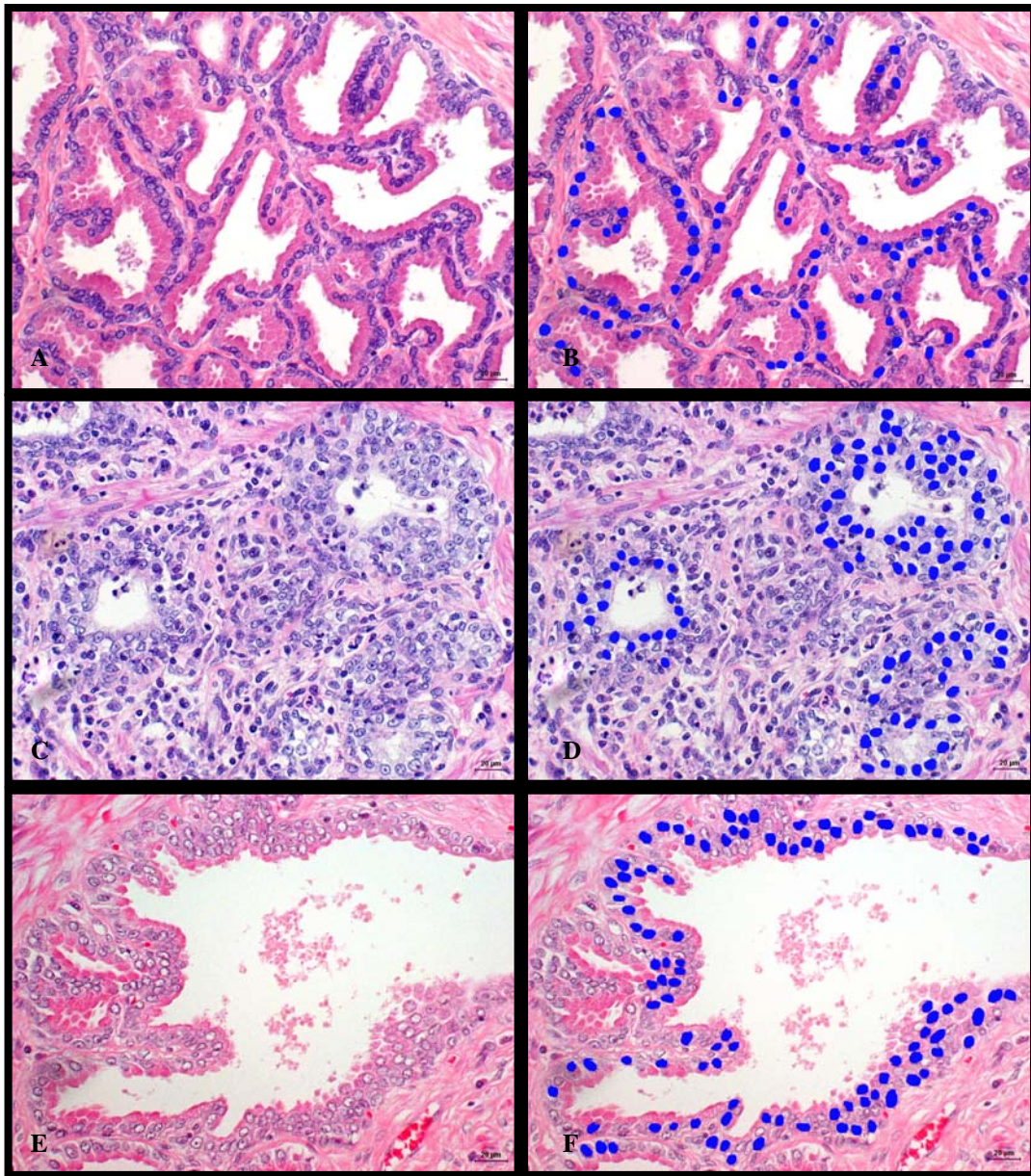
**Figura 41: Próstata canina. Predomínio de grandes NOR's agregadas, correspondendo ao nucléolo, no interior dos núcleos de ácinos contendo PIA. AgNOR.**

### **4.3) Análise morfométrica**

A análise morfométrica nuclear baseou-se na mensuração da área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ ), perímetro nuclear ( $\mu\text{m}$ ) e do fator de circunferência nuclear (FCN) das células epiteliais de ácinos normais, focos de PIA e de HGPIN como ilustra a Figura 22.

Para facilidade de entendimento dos dados apresentados, os valores de área e perímetro nuclear foram divididos por 1.000, e estes foram estatisticamente diferentes entre os três grupos (Tabela 14). O FCN não diferiu significativamente entre os grupos de HGPIN e PIA, contudo foi estatisticamente maior nestes grupos que em células de ácinos normais (Tabela 14).

Quando avaliados os subgrupos de PIA, os resultados obtidos evidenciaram aumento progressivo significativo da área nuclear a partir das células acinares normais, PIA-D, PIA-M, HGPIN e PIA-I (Tabela 15). Células de ácinos normais apresentaram perímetro nuclear significativamente menor que os outros grupos, e aquelas provenientes de focos de PIA-I e PIA-D valores significativamente maiores que o restante, inclusive HGPIN. O maior valor para o FCN foi obtido para o subgrupo PIA-D, sendo estatisticamente diferente de todos os outros grupos. O grupo normal apresentou valor significativamente menor que todos os outros grupos, enquanto PIA-M, PIA-I e HGPIN apresentaram valores intermediários e não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 15).



**Figura 42: Fotomicrografias. Próstata canina. A, B) Ácinos normais antes (A) e após a delimitação nuclear (pontos azuis) (B). HE. C, D) Ácinos contendo PIA antes (C) e após a delimitação nuclear (pontos azuis) (D). HE. E, F) Foco de HGPIN antes (E) e após a delimitação nuclear (pontos azuis) (F).**

**Tabela 14: Médias de área nuclear, perímetro nuclear e fator de circunferência nuclear em ácinos normais, HGPIN e PIA.**

Classificação	*Área nuclear ( $\mu^2$ )	*Perímetro nuclear( $\mu$ )	*FCN
Normal	30,26 $\pm$ 6,51a	21,40 $\pm$ 2,41a	1,15 $\pm$ 0,14a
PIA	35,66 $\pm$ 11,78b	23,57 $\pm$ 4,48b	1,19 $\pm$ 0,14b
HGPIN	34,43 $\pm$ 9,47c	23,13 $\pm$ 3,65c	1,19 $\pm$ 0,15b

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,005$ ). FCN: Fator de circunferência nuclear. \*Média  $\pm$  Desvio Padrão.

**Tabela 15: Médias de área nuclear, perímetro nuclear e fator de circunferência nuclear em ácinos normais, HGPIN, PIA-D, PIA-M e PIA-I.**

Classificação	*Área nuclear ( $\mu^2$ )	*Perímetro nuclear( $\mu$ )	*FCN
Normal	30,26 $\pm$ 6,51a	21,39 $\pm$ 2,41a	1,14 $\pm$ 0,14a
PIA-D	32,97 $\pm$ 10,34b	23,86 $\pm$ 5,62b	1,21 $\pm$ 0,18b
PIA-M	34,36 $\pm$ 9,37c	23,09 $\pm$ 3,49c	1,18 $\pm$ 0,11c
PIA-I	36,73 $\pm$ 11,67d	23,83 $\pm$ 4,01b	1,18 $\pm$ 0,11c
HGPIN	34,43 $\pm$ 9,51e	23,13 $\pm$ 3,65c	1,19 $\pm$ 0,15c

Médias na mesma coluna seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,005$ ). FCN: Fator de circunferência nuclear. \*Média  $\pm$  Desvio Padrão.

## **5) DISCUSSÃO**

### **5.1) Aspectos gerais dos casos de HGPIN e PIA**

Diversos trabalhos focam as características morfológicas e o comportamento biológico da HGPIN em humanos devido a sua importância como lesão precursora do carcinoma prostático nesta espécie (McNeal e Bostwick, 1986; Hansen e Ostergard, 1990; Bostwick, 1995; Tamboli et al., 1998; Cheng et al., 1999; Baltaci et al., 2000; Montironi et al., 2000; O' Shaughnessy et al., 2002; Bostwick e Qian, 2004; Ananthanarayanan et al., 2006).

Em cães, a lesão foi relatada inicialmente em 1997, contudo ainda há poucas publicações sobre o assunto (Waters et al., 1997; Waters e Bostwick, 1997a; Waters e Bostwick, 1997b; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998; Medewell et al., 2004; Rossignol et al., 2004). No presente estudo, os casos de HGPIN foram classificados morfológicamente, de acordo com os critérios propostos por Bostwick (1995). Um parâmetro importante para a diferenciação entre focos de HGPIN e de carcinoma prostático é a manutenção da camada de células basais nos casos de HGPIN e sua descontinuidade ou ausência nos casos de carcinoma, entretanto, tal aspecto morfológico não pôde ser aplicado, visto que tanto a literatura (Leav et al., 2001; Rossignol et al., 2004) quanto nossa experiência prévia (Di Santis, 2003) já haviam demonstrado que no cão esta camada é naturalmente descontínua, mesmo nas glândulas normais.

Embora diversas similaridades estejam presentes entre o homem e o cão quanto à neoplasia intra-epitelial e o carcinoma prostáticos (Leav e Ling, 1968; Bell et al., 1991; Waters et al., 1997; Waters e Bostwick, 1997a; Waters e Bostwick, 1997b; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998; Cornell et al., 2000; Teske et al., 2002), uma diferença importante destaca-se e dificulta o desenvolvimento de um maior número de estudos em cães que é a baixa incidência destas lesões na próstata canina. Quanto ao câncer, tal constatação já é bem estabelecida (Leav e Ling, 1968; Cornell et al., 2000; Teske et al., 2002), mas no que concerne à HGPIN, ainda é assunto controverso. Enquanto Waters e Bostwick (1997a) referem incidência de 55% de focos de HGPIN em glândulas supostamente normais de cães não castrados, com idade entre sete e 17 anos, Rossignol et al. (2004) e Medewell et al. (2004) não observaram nenhum foco da lesão avaliando, respectivamente, 22 e 115 amostras sem diagnóstico prévio de carcinoma.

No presente estudo, a seleção do material foi direcionada, com base no diagnóstico prévio de displasia glandular, embora no conceito genérico do termo e não designando propriamente HGPIN, mas mesmo assim oito amostras apresentaram a lesão, a despeito da faixa etária dos animais ter sido elevada. Um dos casos de HGPIN ocorreu em concomitância com carcinoma prostático neste estudo, o que difere da maioria dos dados encontrados na literatura quanto à elevada ocorrência simultânea destas duas lesões (Waters et al., 1997; Aquilina et al., 1998;

Medewell et al., 2004). Visto que as amostras utilizadas são provenientes de necropsia, é possível que o animal tenha vindo a óbito antes do desenvolvimento do câncer, e que talvez, se o material fosse proveniente de biopsia, em uma análise subsequente poderia ser diagnosticado carcinoma prostático, como ocorre com grande frequência no homem (Billis, 2003).

Futuramente pretendemos aplicar a recente classificação humana para atrofia parcial da próstata (De Marzo et al., 2006) nas glândulas caninas, contudo tal objetivo não foi alvo deste trabalho, de forma que os focos de PIA aqui estudados variaram quanto ao aspecto histológico.

A PIA foi observada em 56 das 64 amostras selecionadas, com diferentes graus de inflamação adjacente, o que sugere que esta ocorra com alta frequência na próstata canina, assim como na glândula humana (De Marzo et al., 1999). Entretanto, houve associação com carcinoma em um caso, enquanto em humanos a concomitância entre as duas lesões é mais comum (Putzi e De Marzo, 2000; Tomas et al., 2007).

## **5.2) Avaliação imunoistoquímica e de AgNOR**

O índice proliferativo é um biomarcador com valor prognóstico para a avaliação de lesões potencialmente pré-malignas em humanos, como HGPIN e PIA, visto que tende a se apresentar em posição intermediária entre o observado no tecido normal e nas células cancerosas (Helpap,

1995; Feneley et al., 1996; Tamboli et al., 1996; Johnson et al., 1998; Cheng et al., 1999; De Marzo et al., 1999; Faith et al., 2005).

No presente estudo, pudemos constatar que focos de HGPIN e de PIA apresentaram índice proliferativo significativamente mais elevado que de ácinos normais. Tais achados indicam que as células epiteliais dos focos de HGPIN e PIA em cães encontram-se sob estímulo proliferativo exacerbado, seja por um descontrole nos mecanismos que regulam a proliferação celular normal, o que seria mais provável nos casos de HGPIN, ou por um estímulo regenerativo frente à injúria celular, como resposta à agressão causada pelo processo inflamatório nos casos de PIA.

Além disso, as lesões prostáticas aqui estudadas apresentaram células em proliferação tanto no compartimento secretor quanto basal, enquanto em glândulas normais somente o epitélio basal mostrou-se proliferativo, assim como foi relatado em próstatas humanas sob as mesmas condições (Mc Neal et al., 1995; Leav et al., 1996; Algaba, 1997; Helpap, 1998). O fato de serem observadas células proliferando no compartimento secretor é considerado em humanos, um sinal de indiferenciação celular (McNeal et al., 1995; Leav et al., 1996; Helpap, 1998), o que torna estas células alvos potenciais para a transformação neoplásica (Pearsons et al., 2001; van Leenders et al., 2003), e pode progressivamente propiciar a perda gradativa das células basais e facilitar a extensão da lesão para o estroma (Algaba, 1997).

A única exceção com relação ao estado proliferativo expressou-se quando comparamos os índices de ácinos normais, HGPIN e dos três subgrupos de PIA, situação esta em que não houve nenhuma diferença estatisticamente detectável. Tendo em vista a diferença constatada entre ácinos normais e aqueles com algum tipo de lesão com o anticorpo PCNA e com a coloração de AgNOR, assim como a diferença significativa verificada com a utilização de KI-67 quando foram avaliados exclusivamente os três grupos principais, acreditamos que os baixos valores originalmente detectados, aliados à subdivisão dos dados, e ao menor número de amostras nesta avaliação, visto que 13 amostras não foram reativas para o anticorpo, propiciaram tais resultados.

Sabe-se que o anticorpo PCNA pode superestimar o número de células em divisão em um tecido, por ter meia vida longa e que, por outro lado, o anticorpo Ki-67 é muito sensível à fixação prolongada com formalina, o que em geral danifica os epítomos impossibilitando a reação antígeno-anticorpo (de Mello e Alves, 1999). No presente estudo, 13 das 64 próstatas utilizadas não apresentaram imunoreatividade para o anticorpo KI-67, provavelmente devido à fixação excessiva.

Assim, quando um estudo envolve material arquivado, onde não há controle sobre as condições de fixação e processamento, acreditamos que o PCNA seja uma alternativa viável, visto que pode ser feita uma comparação com a marcação obtida no tecido normal, como observado por McNeal et al. (1995). Além disso, no presente trabalho houve

correlação do índice proliferativo obtido com PCNA e KI-67, demonstrando que, embora numericamente os valores tenham sido muito diferentes, o comportamento proliferativo foi semelhante com ambos os marcadores.

Visto que não obtivemos marcação para o anticorpo bcl-2, optamos por utilizar o anticorpo caspase 3 clivada que permite a identificação de células em apoptose (Winter et al., 2001; Ananthanarayanan et al., 2006). A intenção inicial era analisar se nos casos de HGPIN e PIA estaria havendo inibição de apoptose e maior predisposição à instabilidade genética. Visto que não foi possível, buscamos avaliar se ao mesmo tempo em que ocorreria aumento do índice proliferativo haveria também aumento do índice apoptótico nos casos aqui estudados.

Quando considerados os grupos principais (normal, HGPIN e PIA) ou subgrupos (normal, HGPIN e subgrupos de PIA), o índice apoptótico não foi maior nos focos de PIA que em ácinos normais, de maneira semelhante ao que ocorre em humanos, o que nos leva a concordar com a hipótese de De Marzo et al. (1999) de que alguma perda celular deva estar compensando a proliferação, mas que não deva estar relacionada à mecanismos apoptóticos, já que as lesões não aumentam em volume.

Já nos casos de HGPIN, quando comparados os grupos normal e PIA, notou-se aumento do índice apoptótico nos focos desta lesão com relação ao epitélio normal, o que não é observado por outros autores na HGPIN ou nos carcinomas humanos (Winter et al., 2001;

Ananthanarayanan et al., 2006). Por outro lado, quando a comparação incluiu os subgrupos de PIA tal diferença não foi observada. Neste caso, duas hipóteses podem ser consideradas: pelo fato dos valores serem originalmente muito baixos, a subdivisão dos dados pode ter propiciado a sobreposição dos desvios padrão, gerando este resultado, o que pode ser futuramente verificado com a utilização de um maior número de amostras, ou então poderíamos inferir que no cão a inibição da apoptose nos casos de HGPIN não é tão importante como nos humanos (McNeal et al., 1995; Johnson et al., 1998; Haussler et al., 1999; Baltaci et al., 2000).

Se esta suposição for válida, o fato de não haver um descontrole na expressão de bcl-2 na HGPIN canina pode ser um fator importante na baixa incidência de câncer prostático na espécie, visto que a inibição da apoptose está envolvida na carcinogênese prostática humana, onde o câncer ocorre com alta frequência (McNeal et al., 1995; Moul et al., 1996; Johnson et al., 1998; Haussler et al., 1999; Baltaci et al., 2000). Acreditamos ser relevante, em futuros estudos, buscarmos alternativas para a avaliação concreta desta possibilidade.

Um outro fato importante foi a negatividade para o anticorpo p-53 de forma generalizada neste estudo. Em ácinos normais, tal fato já era esperado, todavia a ausência de expressão nos focos de HGPIN e PIA é altamente relevante, visto que o acúmulo de p-53, e sua conseqüente detecção por imunistoquímica, estão relacionados à produção alterada

da proteína, a qual deixa de desempenhar sua função, permitindo que células contendo erros no DNA perpetuem (Schmitt, 1999).

Em humanos a expressão da proteína p-53 está relacionada a índices proliferativos mais elevados no câncer prostático e na HGPIN (Cheng et al., 1999; Leite et al., 1999), e a um fenótipo mais agressivo no câncer (Stricker et al., 1996; Cheng et al., 1999), sendo sua mutação detectada também na atrofia pós-atrótica da próstata (Tsujimoto et al., 2002). Ainda, embora não haja estudos sobre a expressão de p-53 na próstata canina, sua expressão no carcinoma inflamatório mamário de cadelas está relacionada a um pior comportamento clínico e maior agressividade (Pena et al., 2003). Uma vez que as amostras foram negativas, podemos inferir que mutações no gene p-53 não estão presentes na HGPIN e na PIA canina, e partindo do suposto que estas são lesões pré-malignas, isto poderia representar um fator protetor quanto ao desenvolvimento do câncer prostático em cães.

A perda de expressão de E-caderina observada, tanto quanto à intensidade quanto à homogeneidade de marcação, nos casos de HGPIN e PIA estudados é mais um fator relevante na determinação do potencial pré-maligno destas lesões, levando em consideração estudos humanos, nos quais tal perda está relacionada ao grau de malignidade dos carcinomas (Ross et al., 1994; Paul et al., 1997; De Marzo et al., 1999c), ocorrência de metástases, sobrevida e progressão da doença após prostatectomia radical (Paul et al., 1997).

Quanto à imunofenotipagem do infiltrado inflamatório adjacente aos focos de PIA, independentemente do grau de inflamação, sempre houve predomínio de linfócitos T, assim como observado na PIA humana (De Marzo et al., 1999; Wang et al., 2004). As substâncias liberadas por estas células podem ser relevantes na carcinogênese prostática (Platz e De Marzo, 1999; Palapattu et al., 2004), inclusive relacionando-se à expressão de COX-2, aparentemente envolvida na carcinogênese prostática canina (Rodrigues, 2007).

Curiosamente, uma das amostras (caso 62) obteve menos de 50% de marcação para os anticorpos CD3 e CD79a, sugerindo que neste caso outros tipos de células inflamatórias estejam presentes em grande número. Visto que as células observadas na coloração de HE foram sempre predominantemente mononucleares, poderíamos pressupor que se trate de macrófagos, células estas que vêm sendo encontradas nos casos de PIA humana (De Marzo et al., 1999; Wang et al., 2004; Tomas et al., 2007). Futuros estudos poderiam incluir anticorpos para a identificação destes tipos celulares, de forma a tornar a caracterização do infiltrado inflamatório que compõe estas lesões no cão mais completa.

O padrão de AgNOR encontrado no presente estudo em todos os grupos avaliados foi predominantemente o de NOR's agregadas, compondo um único nucléolo, o que não está relacionado com um fenótipo maligno (Crocker et al., 1989; Chiusa et al., 1997), entretanto, o número de NOR's por núcleo foi significativamente maior nos casos de

HGPIN e PIA que em ácinos normais, assim como observado em focos de HGPIN e de adenocarcinomas prostáticos humanos (Hansen e Ostergard, 1990). Este achado reflete o elevado estado proliferativo das lesões, como explanado previamente.

Nas análises acima descritas, pudemos ainda observar que os resultados obtidos para HGPIN e PIA raramente diferiram estatisticamente, o que aproxima o comportamento biológico destas duas lesões entre si como pré-malignas, além das semelhanças já comentadas anteriormente com as lesões humanas.

No que concerne à PIA, a subdivisão em três grupos de acordo com o grau de inflamação associada não trouxe, na maioria dos casos, diferenças que pudessem ser interpretadas como importantes no comportamento destas lesões. Talvez, uma vez estabelecida morfológicamente, o grau de inflamação deixe de ser um aspecto determinante no comportamento da lesão, desde que exista inflamação.

### **5.3) Avaliação morfométrica**

Os resultados obtidos no presente estudo com relação à morfometria nuclear indicam que a área nuclear representou de maneira fidedigna as observações realizadas durante a análise morfológica das lesões, visto que os resultados foram significativamente diferentes entre os grupos avaliados, independentemente da forma de comparação. Neste contexto, a área nuclear de células provenientes dos focos de PIA foi

maior que dos focos de HGPIN, e esta foi maior que a obtida de ácinos normais.

Quanto ao perímetro nuclear e ao FCN, embora os resultados tenham variado, em casos de HGPIN e PIA os valores sempre foram significativamente maiores que em ácinos normais. Tais resultados indicam que frente a estas alterações os núcleos celulares estão aumentando em volume, ao mesmo tempo que alteram seu formato, de forma a se distanciar de um círculo perfeito, característica esta que em humanos está relacionada à agressividade do câncer prostático e à pior prognóstico clínico (Diamond et al., 1982; Epstein et al., 1984; Nafe e Froneberg, 1989), o que corrobora com o potencial pré-maligno dessas lesões.

#### **5.4) Comentários finais**

O aspecto proliferativo das atrofia inflamatórias caninas aqui estudadas foi confirmado pela marcação com os anticorpos PCNA e KI-67, e pela coloração de AgNOR. Tal fato, associado à presença constante do infiltrado inflamatório adjacente aos focos de atrofia, nos permitiu denominar estas lesões de atrofia inflamatória proliferativa (PIA), seguindo a classificação humana proposta por De Marzo et al. (1999), sendo em nosso conhecimento o primeiro trabalho a caracterizar morfológica e imunofenotipicamente a PIA no cão.

Apesar da baixa incidência de câncer prostático em cães, é notório que se trata de uma doença agressiva, com alta incidência de metástases (Kozlowski, 1999; Cornel et al., 2000) e com inúmeras similaridades com a doença humana (Leav e Ling, 1968; Bell et al., 1991; Waters et al., 1997; Waters e Bostwick, 1997a; Aquilina et al., 1998; Waters et al., 1998; Cornell et al., 2000; Teske et al., 2002). Desta forma, acreditamos que futuros estudos envolvendo a carcinogênese prostática canina, assim como o comportamento biológico, a terapêutica, a existência e o significado de lesões precursoras mantenham-se com importância inegável.

Muitos dos marcadores prognósticos utilizados nas lesões abordadas neste estudo apresentaram dados semelhantes aos descritos na literatura humana para HGPIN, PIA ou carcinoma prostático, como por exemplo, a presença de células em proliferação no compartimento secretor (Mc Neal et al., 1995; Leav et al., 1996; Algaba, 1997; Helpap, 1998), índice proliferativo mais elevado nos casos de HGPIN e PIA que o de ácinos normais (Helpap, 1995; Tamboli et al., 1996; Johnson et al., 1998; Cheng et al., 1999), alterações na morfologia nuclear (Diamond et al., 1982; Nafe e Frohneberg, 1989), maior número de NOR's por núcleo (Hansen e Ostergard, 1990; Helpap e Riede, 1995) e a perda de expressão de E-caderina (Ross et al., 1994; Paul et al., 1997; De Marzo et al., 1999c)

Ao mesmo tempo, a expressão de p-53 não foi detectada nos focos de HGPIN estudados, o que indica que este pode ser um mecanismo de defesa efetivo da próstata canina que justifique a baixa incidência de câncer em relação ao homem. Talvez, a viabilidade do gene p-53 determine a não progressão, ou a progressão mais lenta para o câncer. O mesmo vale para a PIA, onde há lesão celular causada por fatores liberados pelas células inflamatórias, mas sem alteração do gene p-53, o que permite parar a divisão celular e corrigir a fita de DNA ou induzir a apoptose.

Acreditamos que HGPIN e PIA no cão possam ser modelos úteis no estudo da carcinogênese, não somente pelas semelhanças entre as duas espécies no que se refere às lesões prostáticas, mas enfocando a principal diferença entre elas, que é a baixa incidência de câncer prostático no cão. Visto que, uma vez estabelecido o câncer na próstata canina, a doença progride de forma similar nas duas espécies, seria importante a busca de fatores intrínsecos e extrínsecos que adiem ou protejam a glândula quanto à transformação maligna em cães.

Um alvo para futuros estudos seria a avaliação da expressão de p-53 nos carcinomas prostáticos caninos, já que sua ação poderia estar inserida na carcinogênese de forma tardia, e também dos outros biomarcadores utilizados neste estudo, uma vez que podem estar envolvidos no comportamento biológico agressivo desta lesão.

## 6) CONCLUSÕES

- A atrofia inflamatória proliferativa (PIA) foi caracterizada morfológica e imunofenotipicamente pela primeira vez na próstata canina, distinguindo-se pela expressão de biomarcadores (elevado índice proliferativo, indiferenciação de células secretoras, perda de expressão para E-caderina, morfometria nuclear) que validam o potencial pré-maligno desta lesão;
- Resultados apresentados concernentes aos biomarcadores avaliados (elevado índice proliferativo, indiferenciação de células secretoras, perda de expressão para E-caderina, morfometria nuclear) dão suporte à teoria de que HGPIIN seja uma lesão potencialmente pré-maligna na próstata canina;
- A integridade do gene p-53 pode ser um fator determinante na não progressão da HGPIIN para câncer prostático, justificando a baixa incidência deste no cão, embora mutações possam ocorrer em fases tardias.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALGABA, F. Neoplasia intra-epitelial prostática. **Urol Contemp**, v. 3, p. 174-9, 1997.
- ANANTHANARAYANAN, V.; DEATON, R.J.; YANG, X.J.; PINS, M.R.; GANN, P.H. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. **BMC Cancer**, v. 6, n. 76, p. 1-9, 2006.
- AQUILINA, J.W.; McKINNEY, L.; PACELLI, A.; RICHMAN, L.K.; WATERS, D.J.; THOMPSON, I.; BURGHARDT Jr. W.F.; BOSTWICK, D.G. High grade prostatic intraepithelial neoplasia in military working dogs with and without prostate cancer. **Prostate**, v. 36, p. 189-93, 1998.
- BALTACI, S.; ORHAN, D.; OZER, G.; TOLUNAY, O.; GOGUS, O. Bcl-2 proto-oncogene expression in low and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Brit J Urology Int**, v. 85, p. 155-159, 2000.
- BARSANTI, J.A., FINCO, D.R. Moléstias prostáticas do cão. In: ETTINGER, S.J. (Eds). **Tratado de medicina interna veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole. v.4, 1992. p.1941-63.
- BARSANTI, J.A. Prostatic infections: diagnosis and therapy. **Bayer Selected Proceedings**, p. 40-9, 1998.
- BARSANTI, J.A. Prostatic hyperplasia: medical therapy. In: **Proc Am Clin Vet Int Med**, Chicago, 17, 1999, p. 536-8.

- BELL, F.W.; KLAUSNER, J.S. HAYDEN, D.W.; FEENEY, D.A.; JOHNSTON, S.D. Clinical and pathologic features of prostatic adenocarcinoma in sexually intact and castrated dogs: 31 cases (1070-1987). **JAVMA**, v. 199, n. 11, p. 1623-1630, 1991.
- BERMAN, D.M.; YANG, J.; EPSTEIN, J.I. Foamy gland high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 24, n. 1, p. 140-144, 2000.
- BILLIS, A. Neoplasia intra-epitelial prostática. *In: Patologia cirúrgica da próstata*, Digital do Brasil Gráfica:Campinas, p. 67-76, 2003.
- BOONE, C.W.; KELLOFF, G.J. Biomarker end-points in cancer chemoprevention trials. **IARC Scient Public**, n. 142, p. 273-80, 1997.
- BOSTWICK, D.G.; BRAWER, M.K. Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. **Cancer**, v. 59, p. 788-794, 1987.
- BOSTWICK, D.G. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia: the most likely precursor of prostate cancer. **Cancer**, v. 75, p. 1823-36, 1995.
- BOSTWICK, D.G.; LESKE, D.A.; QIAN, J.; SINHA, A.A. Prostatic intraepithelial neoplasia and well differentiated adenocarcinoma maintain an intact basement membrane. **Pathol Res Pract**, v. 191, p. 850-855, 1995.
- BOSTWICK, D.G. Neoplasms of the prostate. *In: Bostwick, D.E.; Eble, J.N. Urol Surg Pathol*, St Louis: Mosby, p. 343-421, 1997.
- BOSTWICK, D.G.; RAMMANI, D.; QIAN, J. Prostatic Intraepithelial neoplasia: animal models 2000. **Prostate**, v. 43, p. 286-294, 2000.

- BOSTWICK, D.G.; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Mod Pathol**, v. 17, p. 360-79, 2004.
- BRAWER, M.K. Prostatic intraepithelial neoplasia: A premalignant lesion. **Hum Pathol**, v. 23, n. 3, p. 242-248, 1992.
- CHENG, L.; SEBO, T.J.; CHEVILLE, J.C.; PISANSKY, T.M.; SLEZAK, J.; BERGSTRALH, E.J.; PACELLI, A.; NEUMANN, R.M.; ZINCKE, H.; BOSTWICK, D.G. p53 overexpression is associated with increased cell proliferation in patients with locally recurrent prostate carcinoma after radiation therapy. **Cancer**, v. 85, p. 1293-99, 1999.
- CHIUSA, L.; GALLIANO, D.; FORMICONI, A.; DI PRIMIO, O.; PICH, A. High and low risk prostate cancer carcinoma determined by histologic grade and proliferative activity. **Cancer**, 79, p. 1956-63, 1997.
- CORNELL, K.K.; BOSTWICK, D.G.; COOLEY, D.M.; HALL, G.; HARVEY, H.J.; HENDRICK, M.J.; PAULI, B.U.; RENDER, J.A.; STOICA, G.; SWEET, D.C.; WATERS, D.J. Clinical and pathological aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: A retrospective analysis of 76 cases. **Prostate**, v. 45, p. 173-183, 2000.
- COWAN, L.A.; BARSANTI, J.A.; CROWELL, W.; BROWN, J. Effects of castration on chronic bacterial prostatitis in dogs. **JAVMA**, v. 199, n. 3, p. 346-350, 1991.
- CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. **J Pathol**, v. 158, p. 185-88, 1989.

- DE MARZO, A.M.; COFFEY, D.S.; NELSON, W.G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. ***Urology***, v. 53, suppl. 3A, p. 29-40, 1999a.
- DE MARZO, A.M.; MARCHI, V.L.; EPSTEIN, J.I.; NELSON, W.G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: Implications for prostatic carcinogenesis. ***Am J Pathol***, v. 155, n. 6, p. 1985-92, 1999b.
- DE MARZO, A.M.; KNUDSEN, B.; CHAN-TACK, K.; EPSTEIN, J.I. E-cadherin expression as a marker of tumor aggressiveness in routinely processed radical prostatectomy specimens. ***Urology***, v. 53, n. 4, p. 707-13, 1999c.
- DE MARZO, A.M.; NELSON, W.G.; ISAACS, W.B.; EPSTEIN, J.I. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. ***Lancet***, v. 361, p. 955-964, 2003a.
- DE MARZO, A.M.; MEEKER, A.K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E.A.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. Human prostate cancer precursors and pathobiology. ***Urology***, v. 62, suppl 5A, p. 55-62, 2003b.
- DE MARZO, A.M.; PLATZ, E.A.; EPSTEIN, J.I.; ALI, T.; BILLIS, A.; CHAN, T.Y.; CHENG, L.; DATTA, M.; EGEVAD, L.; ERTOY-BAYDAR, D.; FARRE, X.; FINE, S.W.; ICZKOWSKI, K.A.; ITTMANN, M.; KNUDSEN, B.S.; LODA, M.; LOPEZ-BELTRAN, A.; MAGI-GALLUZZI, C.; MIKUZ, G.; MONTIRONI, R.; PIKARSKY, E.; PIZOV, G.; RUBIN, M.A.; SAMARATUNGA, H.; SEBO, T.; SESTERHENN, I.A.; SHAH, R.B.;

- SIGNORETTI, S.; SIMKO, J.; THOMAS, G.; TRONCOSO, P.; TSUZUKI, T.T.; VAN LEENDERS, G.J.; YANG, X.J.; ZHOU, M.; FIGG, W.D.; HOQUE, A.; LUCIA, M.S. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. **Am J Surg Pathol**, v. 30, n. 10, p. 1281-1291, 2006.
- DE MELLO, E.S.; ALVES, V.A.F. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V.A.F. et al. **Manual de imuno-histoquímica**, São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, p. 182-94, 1999.
- DE MOURA, V.M.B.D. **Estudo laboratorial, anatomopatológico e imunoistoquímico da próstata de cães adultos**. Botucatu, 2004. 144p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- DI SANTIS, G.W. **Estudo morfológico, morfométrico e imunoistoquímico de próstatas caninas normais e hiperplásicas**. Botucatu, 2003. 128p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- DI SILVERINO, F.; GENTILE, V.; DE MATTEIS, A.; MARIOTTI, G.; GIUSEPPE, V.; LUIGI, P.A.; SCIARRA, A. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. **Eur Urol**, v. 43, p. 164-175, 2003.
- DIAMOND, D.A.; BERRY, S.J.; JEWETT, H.J.; EGGLESTON, J.C.; COFFEY, D.S. A new method to assess metastatic potencial of human

- prostate cancer: relative nuclear roundness. **J Urol**, v. 128, p. 729-34, 1982.
- DORFMAN, M. & BARSANTI, J. Diseases of the canine prostatic gland. **Comp Cont Ed**, v. 17, p. 791-811, 1995.
- DRAGO, J.R.; MOSTOFI, F.K.; LEE, F. Introductory remarks and workshop summary. **Urology**, v. 34 (suppl), p. 2-3, 1989.
- DUNDOR, P.A. Atypical small acinar proliferations (ASAP) suspicious for malignancy in prostate needle biopsies. **J Urol Pathol**, v. 8, p. 21-29, 1998.
- EPSTEIN, J.I.; BERRY, S.J.; EGGLESTON, J.C. Nuclear roundness factor. **Cancer**, v. 54, p. 1666-71, 1984.
- EPSTEIN, J.I. Non-neoplastic diseases of the prostate. In: BOSTWICK, D.E., EBLE, J.N. **Urol Surg Pathol**, St Louis: Mosby. 1997. p.307-16.
- FAITH, D.; HAN, S.; LEE, D.K.; FRIEDL, A.; HICKS, J.L.; DE MARZO, A.M.; JARRARD, D.F. p16 is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. **Prostate**, v. 65, p. 73-82, 2005.
- FENELEY, M.R.; YOUNG, M.P.A.; CHINYAMA, C.; KIRBY, R.S.; PARKINSON, M.C. Ki-67 expression in early prostate cancer and associated pathological lesions. **J Clin Pathol**, v. 49, p. 741-48, 1996.
- FENELEY, M.R.; BUSCH, C. Precursor lesions for prostate cancer. **J Royal Soc Med**, v. 90, p. 533-539, 1997.

- HANSEN, A.B.; OSTERGARD, B. Nucleolar organizer regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. **Virchows Arch A Pathol Anat**, v. 417, p. 9-13, 1990.
- HAUSSLER, O.; EPSTEIN, J. I.; AMIN, M.B.; HEITZ, P.U.; HAILEMARIAM, S. Cell proliferation, apoptosis, oncogene, and tumor suppressor gene status in adenosis with comparison to benign prostatic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and cancer. **Hum Pathol**, v. 30, n. 9, p. 1077-1086, 1999.
- HELPAP, B. Cell kinetic studies on prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and atypical adenomatous hyperplasia (AAH) of the prostate. **Path Res Pract**, v. 191, p. 904-07, 1995.
- HELPAP, B.; RIEDE, R. Nucleolar and AgNOR-analysis of prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), atypical adenomatous hyperplasia (AAH) and prostatic carcinoma. **Path Res Pract**, v. 191, p. 381-90, 1995.
- HELPAP, B. Differential diagnosis of glandular proliferations in the prostate. A conventional and immunohistochemical approach. **Virchows Arch**, v. 433, p. 397-405, 1998.
- JOHNSON, M.I.; ROBINSON, M.C.; MARSH, C.; ROBSON, C.N.; Neal, D.E.; HAMDY, F.C. Expression of bcl-2, bax, and p-53 in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and localized prostate cancer: relationship with apoptosis and proliferation. **Prostate**, v. 37, p. 223-29, 1998.

- JOHNSTON, S.D.; KAMOLPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.;  
JOHNSTON, G.R. Prostatic disorders in the dog. **Anim Reprod Sci**, v. 60, p. 405-415, 2000.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.R.; OLSON, P.M.S. Sexual differentiation and normal anatomy the dog. In\_\_\_\_, **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia:WB Saunders, 2001, 592p.
- JONIAU, S.; GOEMAN, L.; PENNING, J.; VAN POPPEL, H. Prostatic intraepithelial neoplasia(PIN): Importance and clinical management. **Eur Urol**, v. 48, p. 379-385, 2005.
- KASTENDIECK, H.; HELPAP, B. Prostatic “dysplasia/atypical hyperplasia”. Terminology, histopathology, pathobiology, and significance. **Urology**, v. 34 (suppl), n. 6, p. 28-42, 1989.
- KOVI, J.; MOSTOFI, F.K. Atypical hyperplasia of prostate. **Urology**, v. 34 (suppl), n. 6, p. 23-27, 1989.
- KOZLOWSKI, J.M. Prostate Cancer. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v. 4, p.67-76.
- KRAWIEC, D.R. Canine prostate disease. **JAVMA**, v. 204, p. 1561-4, 1994.
- KUMAR, V.L., MAJUMDER, P.K. Prostate gland: structure, functions and regulation. **Int Urol Nephrol**, v.27, p.231-43, 1995.
- LAUFER AMORIM, R. **Estudo clínico, laboratorial e anatomopatológico das próstatas de cães adultos**. Botucatu, 2001.

116p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

LEAV, I.; LING, G.V. Adenocarcinoma of the canine prostate. **Cancer**, v. 22, n. 6, p. 1329-1345, 1968.

LEAV, I., et al. Androgen receptor expression in prostatic dysplasia (prostatic intraepithelial neoplasia) in the human prostate: An immunohistochemical and in situ hybridização study. **Prostate**, v. 29, p. 137-45, 1996.

LEAV, I. et al. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of hiperplasia, sex hormone-stimulated growth; and ductal origin of carcinoma. **Prostate**, v. 47, p. 149-163, 2001.

LEITE, K.R.M.; SROUGI, M.; NESRALHAH, L.J.; CAMARA-LOPES, L.H. Analisis of p53 expression and proliferative assessment using PCNA in localized prostate carcinoma. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, p. 283-88, 1999.

LEONG, A.S.Y.; LEONG, F.J.W.M. What we need to know about cancer genes. **Diag Cytopathol**, v. 18, p. 33-40, 1998.

LOWSETH, L.A.; GERLACH, R.F.; GILLETT, N.A.; MUGGENBURG, B.A. Age-related in the prostate and testes of the beagle dog. **Vet Pathol**, v. 37, p. 347-53, 1990.

MATTOS, M.C.F.I. Transtornos do crescimento e da diferenciação celular. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**, 4ed. São Paulo:Atheneu, p. 209-222, 1999.

- MEDEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; DE VERE WHITE, R.W.  
Canine prostatic intraepithelial neoplasia: Is the comparative model relevant? **Prostate**, v. 58, p. 314-317, 2004.
- MAHAPOKAI, W. et al. Immune response in hormonally-induced prostatic hyperplasia in the dog. **Vet immunol immunopathol**, v. 78, p. 297-303, 2001.
- MAI, K.T. et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia involving small ducts and acini. **Histopathol**, v. 46, p. 475-77, 2005.
- McNEAL, J.E.; BOSTWICK, D.G. Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. **Hum Pathol**, v. 17, p. 64-71, 1986.
- MCNEAL, J.E. Significance of duct-acinar dysplasia in prostatic carcinogenesis. **Urology**, v. 34 (suppl), n. 6, p. 9-15, 1989.
- McNEAL, J.E.; HAILLOT, O.; YEMOTO, C. Cell proliferation in dysplasia of the prostate: analysis by PCNA immunostaining. **Prostate**, v. 27, p. 258-68, 1995.
- MELISSARI, M.; BELTRAN, A.L.; MAZZUCHELLI, R.; FROIO, E.; BOSTWICK, D.G.; MONTIRONI, R. High grade prostatic intraepithelial neoplasia with squamous differentiation. **J Clin Pathol**, v. 59, p. 437-439, 2006.
- MONTIRONI, R.; MAZZUCHELLI, R.; ALGABA, F.; LOPEZ-BELTRAN, A. Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. **J Clin Pathol**, v. 53, p. 655-665, 2000.

- MOORE, C.K.; KARIKEHALLI, S.; NAZEER, TIPU; FISHER, H.A.G.; KAUFMAN, R.P.; MIAN, B.M. Prognostic significance of high grade prostatic intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation in the contemporary era. **J Urol**, v. 173, p. 70-73, 2005.
- MOUL, J.W.BETTENCOURT, M.C.; SESTERHENN, I.A.; MOSTOFI, F.K.; McLEOD, D.G.; SRIVASTAVA, S.; BAUER, J.J. Protein expression of p53, bcl-2, and Ki-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in localized prostate cancer. **Surgery**, v. 120, p. 159-67, 1996.
- NAFE, R. & FROHNEBERG, D. Diagnostic and prognostic relevance of morphometric structural analyses of the organs of the urogenital tract. **Urol int**, v. 44, p. 66-70, 1989.
- NICKEL, J.C.; TRUE, L.D.; KRIEGER, J.N.; BERGER, R.E.; BOAG, A.H.; YOUNG, I.D. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. **Brit J Urol Int**, v. 87, p. 797-805, 2001.
- O'SHAUGHNESSY, J.A.; KELOFF, G.J.; GORDON, G.B. et al. Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: An important target for accelerated new agent development. **Cl Can Res**, v. 8, p. 314-46, 2002.
- ORTIZ, J.L.M.; RODRIGUEZ, A.F.; RUIZ, P.L.F.; SERRANO, A.F.; FERNANDEZ, F.N.; GÓMEZ, A.Z. Lesiones premalignas y otras benignas en nódulos de hiperplasia adenomatosa. **Arch Esp Urol**, v. 49, p. 684-87, 1996.

- PACLIKOVA, K.; KOHOUT, P.; VLASIN, M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. **Veterinari Medicina**, v. 51, n. 1, p. 1-13, 2006.
- PALAPATTU, G.S.; SUTCLIFFE, S.; BASTIAN, P.J.; PLATZ, E.A.; DE MARZO, A.M.; ISAACS, W.B.; NELSON, W.G. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 7, p. 1170-1181, 2004.
- PARSONS, J.K.; GAGE, W.R.; NELSON, W.G.; DE MARZO, A.M. p63 protein expression is rare in prostate adenocarcinoma: implications for cancer diagnosis and carcinogenesis. **Urology**, v. 58, p. 619-624, 2001.
- PAUL, R.; EWING, C.M.; JARRARD, D.F.; ISAACS, W.B. The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. **Brit J Urol**, v. 79, p. 37-43, 1997.
- PEÑA, L. et al. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 78, p. 141-148, 2003.
- PIGNATELLI, M. E-cadherina: a biological marker of tumour differentiation. **J Pathol**, v. 171, p. 81-82, 1993.
- PLATZ, E.A.; DE MARZO, A.M. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. **J Urol**, v. 171, p. S36-S40, 2004.

- PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochem J**, v. 18, p. 5-14, 1986.
- PUTZI, M.J.; DE MARZO, A.M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology**, v. 56, p. 828-832, 2000.
- REYES, A. O. et al. Inusual histologic types of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Am J Surg Pathol**, v. 21, n. 10, p. 1215-22, 1997.
- RODRIGUES, M.A.M.; CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos gerais**, 4ed, São Paulo:Atheneu, p. 223-240, 1999.
- RODRIGUES, M.M.P. Imunomarcacão de **COX-2 e TGF-  $\beta$  nas lesões proliferativas da próstata do cão**. Botucatu, 2007, 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- ROSS, J.S.; FIGGE, H.L.; BUI, H.X.; ROSARIO, A.D.; FISHER, A.G.; NAZEER, T.; JENNINGS, T.A.; INGLE, R.; KIM, D.N. E-cadherina expression in prostatic carcinoma biopsies: Correlation with tumor grade, DNA content, pathologic stage, and clinical outcome. **Mod Pathol**, v. 7, p. 835-41, 1994.
- ROSSIGNOL, A.; VILLERS, A.; MOLINIÉ, V.; MAZEROLLES, C.; PRADÈRE, M.; DELVERDIER, M. Histologie et immunohistochimie de

- la prostate du chien. Validité du modèle animal pour l'étude des lésions précancéreuses. **Revue Méd. Vét.**, v. 155, n. 1, p.21-26, 2004.
- SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. 2002, 265p.
- SAS. **User's Guide: basic and statistic**, Cary: SAS, 1999, 1686p.
- SCHLESINGER, C.; BOSTWICK, D.G.; ICZKOWSKI, K.A. High-grade intraepithelial neoplasia and atypical small acinar proliferation: Predictive value for cancer in current practice. **Am J Surg Pathol**, v. 29, p. 1201-1207, 2005.
- SCHMITT, F.C. Marcadores prognósticos em carcinomas mamários. In: ALVES, V.A.F. et al. **Manual de imuno-histoquímica**, São Paulo:Sociedade Brasileira de Patologia, p. 30-46, 1999.
- SCIARRA, A.; VORIA, G.; MARIOTTI, G.; GENTILE, V.; PASTORE, A.; DI SILVERINO, F. Histopathological aspects associated with the diagnosis of benign prostatic hyperplasia: Clinical implications. **Urol Inter**, v. 69, p. 253-262, 2002.
- SHAH, R.; MUCCI, N.R.; AMIN, A.; MACOSKA, J.A.; RUBIN, M.A. Postatrophic hyperplasia of the prostate gland. Neoplastic precursor or innocent bystander? **Am J Pathol**, v. 158, n. 5, p. 1767-1773, 2001.
- SMITH, P.J.; SKILBECK, N.; HARRISON, A.; CROCKER, J. The effect of a series of fixative on the AgNOR technique. **J Pathol**, v. 155, p. 109-12, 1998.

- STRICKER, H.J.; JAY, J.K.; LINDEN, M.D.; TAMBOLI, P.; AMIN, M.B.  
Determining prognosis of clinically localized prostate cancer by immunohistochemical detection of mutant p53. **Urology**, v. 47, p. 366-69, 1996.
- TAMBOLI, P. et al. Immunohistochemical expressions of retinoblastoma and p-53 tumor suppressor genes in prostatic intraepithelial neoplasia: comparasion with prostatic adenocarcinoma and benign prostate. **Mod Pathol**, v. 11, n. 3, p. 247-252, 1998.
- TESKE, E.; NAAN, E.C.; VAN DIJK, E.M.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J.A. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. **Mol Cell Endocrinol**, v. 197, p. 251-255, 2002.
- TOMAS, D.; KRUSLIN, B.; ROGATSCH, H.; SCHAFER, G.; BELICZA, M.; MIKUZ, G. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. **Eur Urol**, v. 51, p. 98-104, 2007.
- TSUJIMOTO, Y.; TAKAYAMA, H.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A.; AOZASA, K. Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: Histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. **Prostate**, v. 52, p. 279-287, 2002.
- VAN LEENDERS, G.J.L.H.; GAGE, W.R.; HICKS, J.L.; VAN BALKEN, B.; AALDERS, T.W.; SCHALKEN, J.A.; DE MARZO, A.M. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. **Am J Pathol**, v. 162, n. 5, p. 1529-1537, 2003.

- WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J.E. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. **Prostate**, v. 61, p. 60-72, 2004.
- WATERS, D.J.; PATRONEK, G.J.; BOSTWICK, D.G.; GLICKMAN, L.T. Comparing the age at prostate cancer diagnosis in humans and dogs. **J Nac Cancer Instit**, v. 88, n. 22, p. 1686-1687, 1996.
- WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. The canine is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. **Antica Res**, v. 17, p. 1467-70, 1997a.
- WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. Prostatic intraepithelial neoplasia occurs spontaneously in the canine prostate. **J Urol**, v. 157, p. 713-16, 1997b.
- WATERS, D.J.; HAYDEN, D.W.; BELL, F.W.; KLAUSNER, J.S.; QIAN, J.; BOSTWICK, D.G. Prostatic intraepithelial neoplasia in dogs with spontaneous prostate cancer. **Prostate**, v. 30, p. 92-7, 1997.
- WATERS, D.J.; SAKR, W.A.; HAYDEN, D.W.; LANG, C.M.; MCKINNEY, L.; MURPHY, G.P.; RADINSKY, R.; RAMONER, R.; RICHARDSON, R.C.; TINDALL, D.J. Workgroup 4: Spontaneous prostate carcinoma in dogs and nonhuman primates. **Prostate**, v. 36, p. 64-67, 1998.
- WEINBERG, R.A. Molecular mechanisms of carcinogenesis. **Scientific American**, v. 96, p. 1-12, 1996.

WINTER, R.N.; KRAMER, A.; BORKOWSKI, A.; KYPRIANOU, N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. **Cancer Res**, v. 61, p. 1227-1232, 2001.

ZHA, S.; GAGE, W.R.; SAUVAGEOT, J.; SARIA, E.A.; PUTZI, M.J.; EWING, C.M.; FAITH, D.A.; NELSON, W.G.; DE MARZO, A.M.; ISAACS, W.B. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. **Cancer Res**, v. 61, p. 8617-8623, 2001.

## **ANEXO A**

Reagentes, soluções e roteiros de coloração citados no texto.

### **Cola à base de organosilano para adesão dos cortes às lâminas**

- ⇒ 225ml álcool etílico absoluto
- ⇒ 25ml 3-Aminopropyl-Triethoxysilane (Sigma A3648)
- ✓ Solução preparada e utilizada em capela devido à alta toxicidade.
- ✓ Banhar as lâminas, previamente limpas, nesta solução por cerca de dez segundos, passar rapidamente em dois álcoois e deixar secar ao ar.

### **Solução de TRIS pH 7,4**

- ⇒ 6g Trizma base ( $C_4H_{11}NO_3$ ) (Sigma - T-1503)
- ⇒ 8,5g cloreto de sódio (NaCl) (Merck 1064041000)
- ⇒ 1000ml água destilada
- ✓ pH 7,4 (solução de ajuste: ácido clorídrico diluído em água destilada na proporção 1:1).

### **Solução de BSA 1%**

#### **Solução A**

- ⇒ 10ml água deionizada
- ⇒ 500mg Albumina bovina (Sigma A7906)

#### **Solução B**

- ⇒ 10ml água deionizada
- ⇒ 500mg azida sódica ( $NaN_3$ ) (Merck 1066880100)

### **Solução de BSA para uso (1%)**

- ✓ 59ml TRIS pH 7,4
- ✓ 1,25ml solução A
- ✓ 2,5ml solução B

⇒ Soluções A e B concentradas a 5%, conservadas congeladas e posteriormente diluídas a 1% para uso como diluente de anticorpos primários.

#### **Solução de citrato 10mM**

⇒ 1000ml água destilada

⇒ 1,921g ácido cítrico anidro (Dinâmica C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>)

✓ pH 6,0 (solução de ajuste: hidróxido de sódio hipersaturado).

#### **Solução de EDTA 100mM**

⇒ 1000ml água destilada

⇒ 0,372g ácido etilenodiaminotetracético - EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)

✓ pH 8,0 (solução de ajuste: hidróxido de sódio hipersaturado).

### **Técnica de coloração para AgNOR**

#### **Solução A**

⇒ 1g de gelatina incolor

⇒ 50 ml de água deionizada

⇒ 0,5 ml de ácido fórmico

#### **Solução B**

⇒ 50g nitrato de prata

⇒ 100 ml água destilada

#### **Triton X-100 (0,5%)**

⇒ 0,5 ml de triton x-100

⇒ 99,5 ml PBS

#### **Roteiro**

1. Desparafinização e desidratação;
2. Água destilada (10 minutos);
3. Triton X 0,5% (15 minutos);

4. Lavar em água corrente (20 minutos);
5. Misturar na hora do uso uma parte da sol. A para duas partes da sol.B;
6. Levar a estufa 37°C durante 10 minutos;
7. Retirar o excesso com água, secar, desidratar, diafanizar e montar.

**Observação:** Nunca pingar a solução contendo prata sobre a lâmina, pois ocorre sedimentação excessiva, deve-se fazer em cuba de vidro ou em bandeja tipo laminário com profundidade para colocar a solução e depois deitar a lâmina com o corte para baixo sobre a solução, desde que fique levemente suspensa e não completamente em contato com a bandeja.

**Os produtos são:**

Nitrato de prata PA (Merck 101512.0100)

Triton x-100 (Sigma 0694-1L)

**Testes realizados para padronização dos anticorpos em tecido canino.**

<b>Anticorpo (clone)*</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação Antigênica</b>	<b>Tecido</b>	<b>Controle Positivo</b>	<b>Kit secundário</b>	<b>DAB</b>	<b>Resultados**</b>
PCNA (PC-10)	1:50 1:100	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Próstata normal - cão	Células basais	LSAB	5' a 15'	++ +
Ki-67 (Ki-S5)	1:50 1:100	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Próstata normal - cão	Células basais	LSAB	5' a 15'	- -
Ki-67 (Mib-1)	1:50 1:100	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Próstata normal - cão	Células basais	LSAB	10' a 30'	+ ±
E-caderina (NCH-38)	1:50 1:75 1:100	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Pele e próstata caninas	Ceratinócitos e epitélio secretor	LSAB	10' a 30'	+ ± ±/-
***CD-3 (policlonal)	1:100	Sol. EDTA pH 8.0, BM, 30'	Linfonodo canino	Linfócitos T	LSAB	12'	+
***CD79a (HM57)	1:50	Sol. EDTA pH 8.0, BM, 30'	Linfonodo canino	Linfócitos B	LSAB	12'	+
Bcl-2 (2/100/D5)	1:80 1:50 1:20	Sol. de citrato pH 6.0 e Sol. EDTA pH 8.0, BM, 40'	Tonsila canina	Linfócitos B da zona do manto	LSAB EnVision	10' a 30'	- - -
p-53 (DO-7)	1:100 1:75 1:50	Sol. de citrato pH 6.0 e Sol. EDTA pH 8.0, BM, 40'	CACE e CA prostático caninos	****	LSAB EnVision	10' a 30'	- - -
p-53 (PAb240)	1:100 1:75 1:50	Sol. de citrato pH 6.0 e Sol. EDTA pH 8.0, BM, 40'	CACE e CA prostático caninos	****	LSAB EnVision	10' a 30'	- - -
p-53 (policlonal)	1:200 1:400 1:600	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	CACE e CA prostático caninos	CACE canino p53 positivo	LSAB EnVision	5' a 10'	++ ++ +
Caspase 3 (policlonal)	1:100 1:200 1:300	Sol. de citrato pH 6.0, BM, 40'	Tonsila canina	Células em apoptose	LSAB EnVision	5' a 10'	+ + ±/-

\* Os anticorpos Ki-67 (clones Ki-S5 e Mib-1), E-caderina, CD3, CD79a e p-53 (clones DO-7 e PAb240) são da marca DakoCytomation<sup>i</sup>; PCNA, Bcl-2 e p-53 policlonal são da Novocastra<sup>j</sup>; e o anticorpo caspase 3 policlonal é da marca Cell Signaling Technology<sup>k</sup>. \*\*Negativo (-), Marcação fraca ou não correspondente ao esperado (±); Marcação positiva com intensidade correspondente ao esperado (+); Marcação excessiva, com excesso de fundo (++) . \*\*\*Anticorpos previamente padronizados no referido laboratório, um único teste trouxe marcação positiva. \*\*\*\*Não dispusemos de um controle positivo para estes clones de p-53. BM: Banho Maria.

<sup>i</sup> DakoCytomation – 6392, Via Real, Carpinteria, CA, USA

<sup>j</sup> Novocastra Laboratories Ltd – Balliol Business Park West, Newcastle Tyne NE12 8EW, UK

<sup>k</sup> Cell Signaling Technology, USA



## ANEXO C

### Dados dos animais e próstatas utilizados

Caso	Nº origem	Idade	Classificação	Diagnóstico prévio
1	289/02-1	4a6m	PIA-M	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear.
2	289/02-2	4a6m	PIA-D	
3	289/02-3	4a6m	PIA-M	
4	290/02-1	7a	PIA-D	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
5	290/02-2	7a	PIA-D	
6	290/02-3	7a	PIA-D	
7	291/02-1	12a	PIA-M	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
8	291/02-2	12a	PIA-M	
9	291/02-3	12a	PIA-M	
10	292/02-1	5a	PIA-D	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
11	292/02-2	5a	PIA-M	
12	292/02-3	5a	PIA-D	
13	293/02-1	6a	PIA-I	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
14	293/02-2	6a	PIA-I	
15	293/02-3	6a	PIA-I	
16	294/02-1	11a	PIA-I	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
17	294/02-2	11a	PIA-I	
18	294/02-3	11a	PIA-I	
19	50/02 1ED	10a	PIA-D	HPB, cisto associado é metaplasia escamosa, focos de atrofia e displasia focos de infiltrado inflamatório mononuclear.
20	50/02 2ED	10a	HGPIN	
21	50/023DV	10a	HGPIN	
22	50/02 C2P	10a	PIA-D	
23	1A(Cr)D	5a	PIA-D	Focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
24	1A(C)D	5a	PIA-D	
25	04(C)E	6a	PIA-M	HPB, focos de atrofia associados a infiltrado inflamatório mononuclear; focos de displasia.
26	04(C)D	6a	PIA-D	
27	04(M)E	6a	HGPIN	
28	04(M)D	6a	PIA-M	
29	04(Cr)E	6a	PIA-D	
30	05(Cr)E	11a	PIA-M	
31	05(Cr)D	11a	PIA-I	Focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear. Adenocarcinoma (fragmento 05(C)D)
32	05(C)D	11a	PIA-I	
33	07(Cr)D	7a	PIA-I	Focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
34	07(Cr)E	7a	PIA-M	
35	07(M)D	7a	PIA-D	
36	07(M)E	7a	PIA-M	
37	08(Cr)E	9a	HGPIN	HPB, focos de atrofia e displasia, focos de infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear. Adenocarcinoma (fragmento 08(M)E).
38	08(C)E	9a	HGPIN	
39	08(M)D	9a	HGPIN	
40	08(M)E	9a	PIA-M	
41	08(C)D	9a	PIA-D	
42	09(M)E	6a	PIA-I	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
43	09(Cr)D	6a	PIA-M	
44	09(M)D	6a	PIA-I	
45	09(Cr)E	6a	PIA-I	

46	12(Cr)E	8a	PIA-I	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear.
47	12(M)D	8a	PIA-I	
48	12(M)E	8a	PIA-I	
49	12(C)D	8a	PIA-I	
50	13(M)D	7a	PIA-D	Focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
51	13(M)E	7a	PIA-D	
52	15(M)D	8a	PIA-D	HPB, focos de atrofia, displasia, focos de infiltrado inflamatório mononuclear.
53	15(C)D	8a	HGPIN	
54	19(M)D	4a	PIA-M	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
55	27(M)	6a	PIA-M	Focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
56	27(Cr)	6a	PIA-M	
57	27(C)	6a	PIA-M	
58	28(M)	6a	HGPIN	HPB, focos de atrofia e displasia, focos de infiltrado inflamatório mononuclear.
59	28(Cr)	6a	PIA-I	
60	28(C)	6a	PIA-M	
61	37(C)D1	7a	PIA-D	
62	38(M)D	7a	PIA-D	HPB, focos de atrofia e displasia associados a infiltrado inflamatório mononuclear.
63	38(Cr)D	7a	PIA-M	
64	38(C)D	7a	PIA-M	