

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE KI-67, COX-2,
MMP-9 E P53 NOS TUMORES TESTICULARES
CANINOS**

Janete Madalena da Silva
Médica Veterinária

ARAÇATUBA-SP
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE KI-67, COX-2,
MMP-9 E P53 NOS TUMORES TESTICULARES
CANINOS**

Janete Madalena da Silva

Orientadora: Prof^a. Adjunto Gisele Fabrino Machado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – Unesp, Campus de
Araçatuba, como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e
Cirúrgica de Pequenos Animais)

ARAÇATUBA-SP
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação(CIP)Serviço Técnico de
Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Silva, Janete Madalena da.

S586e

Expressão imuno-histoquímica de Ki-67, COX-2, MMP-9 e p53
nos tumores testiculares caninos / Janete Madalena da Silva. --
Araçatuba: [s.n], 2014.
51 f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2014.

Orientador: Profa. Adj. Gisele Fabrino Machado

1. Patologia - diagnóstico. 2. Cães. 3. imuno-histoquímica.
4. Neoplasias. 5. Testículo. I. T.

CDD 616.075



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Expressão imuno-histoquímica de Ki-67, COX-2, MMP-9 e p53 nos tumores
testiculares caninos.

AUTORA: JANETE MADALENA DA SILVA

ORIENTADORA: Dra. GISELE FABRINO MACHADO

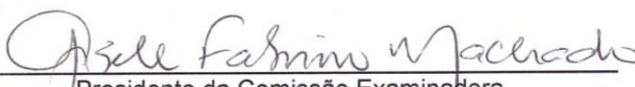
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. FELIPE AUGUSTO RUIZ SUEIRO


Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS


Dra. GISELE FABRINO MACHADO

DATA DA REALIZAÇÃO: 21 de fevereiro de 2014.


Presidente da Comissão Examinadora
Dra. GISELE FABRINO MACHADO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JANETE MADALENA DA SILVA – Nascida em São Paulo no dia 23 de abril de 1988. Iniciou e concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária na Universidade Camilo Castelo Branco – Campus Fernandópolis (2006-2010). Ingressou no Programa de Aprimoramento em Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, São Paulo em 2011. Em 2012 iniciou o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA – UNESP) – UNESP – Araçatuba, São Paulo.

“Calma! Tudo vai dar certo.”
(Braz Félix da Silva)

“And anytime you feel the pain
Hey, Jude. Refrain.
Don’t carry the world upon your shoulders”
(The Beatles)

Dedicatória

À minha mãe, Maria José, pelo apoio, força e esforço para minha formação e realização de mais um sonho.

Ao meu irmão Daniel, meu grande amigo e companheiro para todas as horas.

Aos anjinhos Rafael e Braz, minhas fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado e ao Financiamento do projeto (Processo 2011/16025-7).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida em realizar o curso de mestrado.

A minha orientadora, Gisele Fabrino Machado pela oportunidade, confiança, amizade, pelos ensinamentos transmitidos e compreensão durante esses anos de convivência.

Aos meus pais, Maria José de Souza Silva e Braz Félix da Silva (*in memoriam*) pelo apoio, pela cobrança e incentivo.

Aos meus irmãos, Daniel Félix da Silva e Rafael Félix da Silva (*in memoriam*), pessoas que considero como as de maior pureza de coração. Tê-los como irmãos me fez aprender que em todos os meus relacionamentos, sem amizade e confiança, não existe nada.

A toda a minha família, perto ou distante, sempre mandaram força para eu seguir em frente.

Aos meus amigos que fazem parte de mim, minha segunda família.

As professoras Maria Cecília Rui Luvizotto e Daniela Bernadete Rozza, que contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual, desde a Residência.

Aos funcionários pela colaboração do projeto, em especial ao Lorinaldo Lopes, que sempre me ajudou nas horas mais urgentes.

Aos meus colegas de Pós-Graduação, pela acolhida, pelas horas de descontração, conselhos e ajuda.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Anatomia e desenvolvimento testicular.....	2
2.2. Neoplasia testicular	3
2.3. Marcadores tumorais	6
2.4. Enzima ciclooxygenase-2 (COX-2).....	7
2.5. MMP-9	8
2.6. Proteína Ki-67	10
2.7. p53.....	11
2.8. Objetivos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Seleção das amostras	13
3.2. Imuno-histoquímica	14
3.3. Análise de imagem	15
3.4. Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
4.1. Histórico dos animais.....	17
4.2. Características histopatológicas	17
4.3. Características imuno-histoquímicas	23
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS	36

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE KI-67, COX-2, MMP-9 E P53 NOS TUMORES TESTICULARES CANINOS

RESUMO - As neoplasias testiculares caninas são achados ocasionais. São descritas como benignas, mas podem metastatizar ou mostrar características de malignidade com o avanço da idade do animal, o que torna necessário o melhor entendimento do comportamento destas neoplasias no cão. O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão imuno-histoquímica de Ki-67, COX-2, MMP-9 e p53 em neoplasias testiculares de 50 cães, verificar a relação entre o padrão histológico e raça, idade e posicionamento testicular e verificar a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos avaliados nos diferentes tipos de neoplasia. A avaliação imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, MMP-9 e p53 foi mais intensa nos seminomas, enquanto que os leydigocitomas exibiram maior marcação para COX-2. A avaliação histológica e imuno-histoquímica dos subtipos de seminomas em cães, particularmente o seminoma difuso, podem resultar em diferença significativa que permita a utilização destas proteínas como marcadores de prognóstico. As características histopatológicas em associação ao histórico dos animais e à expressão das proteínas estudadas podem contribuir para a caracterização do comportamento biológico nas neoplasias testiculares caninas.

Palavras-chave: cães, neoplasias, testículo.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF KI-67, COX-2, MMP-9 AND P53 IN CANINE TESTICULAR NEOPLASMS

SUMMARY - Canine testicular neoplasms are sporadic findings. They are described as benign, but they can metastasize or express malignant features with the animal ageing, which makes necessary the better understanding of these neoplasms behavior in dogs. The aim of this study was to characterize the immunoexpression of Ki-67, COX-2, MMP-9 and p53 in testicular neoplasms of fifty dogs, to verify the relation among histological pattern of the neoplasms and breed, age and testicular localization; and also to verify the immunoexpression of these markers in different types of testicular tumours. Ki-67, MMP-9 and p53 immunostaining were more intense in seminomas, whereas COX-2 presented a more intense staining in Leydig cell tumors. The histological and immunohistochemical analyses of the subtypes of canine seminomas, especially the diffuse seminoma, may result in significant differences which would allow the use of these markers as prognostic factors. The histopathological features associated with the day-history of the animals and with these markers may contribute to the characterization of the biological behavior of canine testicular neoplasms.

Key-words: dogs, neoplasms, testicle.

1. INTRODUÇÃO

A incidência das neoplasias nos animais domésticos vem aumentando gradativamente na rotina de diagnóstico em Patologia Veterinária. Tal fato é justificado pela longevidade dos animais de companhia (REIF, 2007), associada à susceptibilidade dos animais idosos aos processos neoplásicos (FREITAS et al., 2006).

Como os animais domésticos estão expostos às mesmas influências ambientais de seus proprietários ao câncer, podem servir como “sentinelas” do risco ao câncer, contribuindo para os estudos da oncologia comparada (D'ANGELO et al., 2012; PINHO et al., 2012; REIF, 2007).

No homem, a complexidade do mecanismo biológico do câncer tem estimulado o desenvolvimento de modelos experimentais que se assemelham de forma natural e espontânea aos aspectos fisiopatológicos da biologia do câncer. Aspectos epidemiológicos, biológicos e clínicos do câncer nos cães são semelhantes ao câncer humano, apontando o potencial da espécie canina como modelo para estudos moleculares dos tumores humanos (PINHO et al., 2012).

O câncer testicular humano acomete homens entre 15 e 35 anos de idade, e representa aproximadamente 25% dos cânceres diagnosticados nos homens com essa faixa etária (GILLIGAN, 2008). Nos cães, os tumores testiculares acometem animais idosos e raramente se metastatiza, embora exiba características histológicas de malignidade (KIM et al., 2010).

A técnica imuno-histoquímica, cada vez mais utilizada na rotina laboratorial da medicina veterinária, pode ser aplicada amplamente como ferramenta auxiliar para o diagnóstico de diversas doenças, principalmente nos processos neoplásicos (HORTA et al., 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anatomia, desenvolvimento e composição celular do testículo

O sistema reprodutivo do macho é composto pelos testículos, ductos genitais, glândulas acessórias e pênis. Possui como principais características a produção, nutrição e transporte de espermatozoides (SAMUELSON, 2007).

Durante a fase pré-natal, o testículo se desenvolve no abdome, medialmente ao rim embrionário. O plexo dos ductos testiculares se desenvolve conectado aos túbulos mesonéfricos para formar o epidídimo, o ducto deferente e a glândula vesicular (HAFEZ, 2004).

As gônadas em desenvolvimento são presas pelos ligamentos cranial e caudal. O ligamento caudal – o gubernáculo testicular primitivo – fixa o testículo em formação na região do canal inguinal. Ele desenvolve-se em uma parte intrabdominal e outra extrabdominal, que se projeta para o interior do escroto. Evaginações do peritônio formam o canal inguinal e a túnica vaginal (FOSTER, 2007).

Durante o processo de descida testicular, as gônadas migram caudalmente dentro do abdome para o anel inguinal profundo, atravessando a parede abdominal para então emergir no anel inguinal superficial, terminando por incluir-se totalmente na bolsa escrotal (HAFEZ, 2004).

Os testículos são basicamente compostos pelos túbulos seminíferos, células de sustentação e células germinativas. Os túbulos seminíferos são glândulas tubulares revestidas pelo epitélio seminífero, onde ocorre a espermatogênese (SAMUELSON, 2007).

As células de sustentação (células de Sertoli) são células de suporte que se estendem da lâmina basal para o lúmen tubular, formando invaginações laterais e junções intercelulares, que formam a barreira hematotesticular (SAMUELSON, 2007).

As células intersticiais (células de Leydig) são localizadas entre os túbulos seminíferos e são responsáveis pela secreção de hormônios masculinos (testosterona) nas veias testiculares e vasos linfáticos (HAFEZ, 2004).

As células espermatogênicas são responsáveis pela formação dos espermatozoides em um processo denominado espermatogênese. Esse processo ocorre pela atividade das espermatogônias que dão origem aos espermatócitos primários e secundários por meiose. As células subsequentes formadas dessa divisão são as espermatídes, que sofrem um processo de maturação até se tornarem livres nas células de sustentação e entram no lúmen do túbulo seminífero, transformando-se em espermatozoides (HAFEZ, 2004; SAMUELSON, 2007).

O controle da espermatogênese é realizado através de fatores centrais, como o estímulo hormonal (hormônios luteinizantes) sobre as células endócrinas intersticiais e hormônio folículo estimulante sobre as células de Sertoli, e por fatores locais, como a testosterona (FOSTER, 2007).

2.2. Neoplasia testicular

Os tumores testiculares estão entre os mais frequentes nos cães, representando cerca de 90% dos tumores genitais dos machos (LIAO et al., 2009). São frequentemente benignos (FOSTER, 2007), porém quando apresentam comportamento agressivo, podem produzir metástase em linfonodos regionais e locais distantes, como fígado, pulmão, rins, baço, adrenais, pâncreas, pele, olhos e sistema nervoso central (FAN; LORIMIER, 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) são classificados em: tumores do cordão sexual e estroma gonadal, incluindo os das células de Sertoli (sertolioma) e de Leydig (leydigocitoma); tumores das células germinativas, como o seminoma, o teratoma e o carcinoma

embrionário; além dos tumores mistos das células germinativas e do cordão espermático (KENNEDY et al., 1998).

O seminoma, o sertolioma e o leydigocitoma são os mais comuns nos testículos do cão, ocorrendo com frequência semelhante (GRIECO et al., 2008), diferente dos humanos onde os tumores de células germinativas representam cerca de 45% das neoplasias testiculares (PAPANOIANNOU et al., 2009).

O leydigocitoma e o seminoma são subclassificados de acordo com Kennedy et al. (1998) em: seminoma intratubular e difuso, leydigocitoma sólido-difuso, angiomatoide (ou cístico vascular) e pseudoadenomatoso. O seminoma intratubular é caracterizado pelo preenchimento dos túbulos seminíferos atróficos por células germinativas neoplásicas arredondadas, de forma focal ou difusa. O seminoma difuso é resultado da extensão das células neoplásicas de dentro dos túbulos para o interstício. As células neoplásicas são redondas, ovais ou poliédricas com citoplasma escasso, núcleo grande, hipercromático e nucléolo proeminente. Células multinucleadas são frequentes, bem como as figuras de mitose que são observadas em quantidade acentuada. O seminoma também possui como característica peculiar o infiltrado linfocitário localizado no estroma tumoral, ao redor de vasos sanguíneos (CIAPUTA et al., 2012; D'ANGELO et al., 2012; FOSTER, 2007; GRIECO et al., 2008; KENNEDY et al., 1998; KIM et al., 2010; MAIOLINO et al., 2004).

O leydigocitoma é subdividido em: angiomatoide, pseudoadenomatoso e sólido-difuso. É composto pelas células de Leydig neoplásicas com padrão que varia entre poliedral, cuboidal ou colunar, com citoplasma amplo, acidofílico, contendo múltiplos vacúolos lipídicos. O núcleo é pequeno, arredondado, hipercromático com um único núcleo. As figuras de mitose são raras (CIAPUTA et al., 2012; D'ANGELO et al., 2012; GRIECO et al., 2008; KENNEDY et al., 1998). O tipo angiomatoide é composto por cordões de 2 a 4 células neoplásicas que circundam fluído que contém eritrócitos. Grandes espaços vasculares também são frequentes. O tipo pseudoadenomatoso é formado por lóbulos de 20 a 30 células neoplásicas que circundam espaços preenchidos

com fluido. Os lóbulos são divididos por uma grande rede de vasos e capilares. As células neoplásicas que compõem o tipo sólido-difuso se organizam em grupos ou cordões septados por um tecido conjuntivo delicado, e se arranjam de forma radial a vasos sanguíneos. Os núcleos são periféricos, formando estrutura em roseta (D'ANGELO et al., 2012; KENNEDY et al., 1998).

O sertolioma, neoplasia das células de suporte dos túbulos seminíferos, se desenvolve principalmente dos testículos criptorquidas, levando muitas vezes ao hiperestrogenismo. É caracterizado microscopicamente por quantidade acentuada de tecido conjuntivo fibroso no interstício e células neoplásicas posicionadas de forma perpendicular a membrana dos túbulos seminíferos (células em paliçada). O núcleo das células é redondo ou fusiforme com citoplasma fracamente eosinofílico, fusiforme e pouco delimitado. Raras figuras de mitose são observadas (BANCO et al., 2010; D'ANGELO et al., 2012; FOSTER et al., 2007; GRIECO et al., 2008; KENNEDY et al., 1998).

Combinações de tipos diferentes podem ocorrer em aproximadamente 25% das neoplasias testiculares caninas, embora os nódulos neoplásicos sejam usualmente separados. Não há implicação de causa comum, mas sim uma multiplicidade de acontecimentos acidentais em um grupo com faixa etária adulta, predisposta à neoplasia (FOSTER; LADDS, 2007).

Seu desenvolvimento pode ser influenciado por vários fatores, incluindo idade, criptorquidismo, exposição à carcinógenos e predisposição racial (LIAO et al., 2009). Os cães das raças Boxer, Pastor alemão, Afgan Hound, Weimaraner e Pastor de Shetland mostram maior potencial para desenvolver as neoplasias testiculares (FAN; LORIMIER, 2007). Em um estudo realizado na Noruega, foi verificada a predominância do sertolioma em cães da raça Collie e em Pastor de Shetland, enquanto que nos cães da raça Norwegian Elkhound houve frequência do seminoma (NØDTVEDT et al., 2010).

Existe alta correlação entre o criptorquidismo e as neoplasias testiculares (GILLIGAN, 2008; FOSTER; LADDS, 2007; MORRIS e DOBSON, 2001). Cães criptorquídicos possuem 10 vezes mais chances de desenvolver neoplasia testicular do que cães normais, com maior frequência no testículo

direito do que no esquerdo, sem que haja explicação para este fato (FOSTER; LADDS, 2007). O posicionamento abdominal ou inguinal dos testículos é um fator relevante no que diz respeito ao desenvolvimento de metade dos sertoliomas e de dois terços dos seminomas. Tal fato é justificado pela temperatura mais alta do abdômen que destrói as células espermatogênicas, permitindo o desenvolvimento anormal das células de Sertoli (MORRIS; DOBSON, 2001).

2.3. Marcadores tumorais

A avaliação imuno-histoquímica tornou-se uma ferramenta auxiliar de diagnóstico cada vez mais relevante na rotina laboratorial, devido a necessidade de um diagnóstico preciso a fim de se determinar tratamento e prognóstico, principalmente no que diz respeito às neoplasias (BARRA, 2006).

Os marcadores tumorais são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelas células neoplásicas ou, secundariamente pelo paciente, em resposta a presença das mesmas (ANDRIOLO, 2005). Um marcador prognóstico pode ser definido como qualquer substância capaz de fornecer informações a respeito da evolução clínica da neoplasia no momento do diagnóstico ou da cirurgia. Para isto, esse marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no processo da cascata metastática. Esse mesmo marcador também poderá ser considerado como preditivo quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica (SCHMITT, 1999).

A imunoexpressão de marcadores do ciclo celular pode indicar anomalias na regulação do ciclo celular, podendo então distinguir o comportamento biológico do tumor, incluindo o fornecimento de informações úteis sobre o grau de malignidade, presença ou não de metástase, taxa de

progressão tumoral, a resposta à terapia e sobrevida livre de doença (PAPAIOANNOU et al., 2009).

Existem marcadores descritos como sensíveis e específicos para o diagnóstico das neoplasias testiculares nos seres humanos (YU et al., 2009). Na medicina veterinária, os marcadores tumorais são amplamente estudados e aplicados na rotina laboratorial. A técnica imuno-histoquímica baseia-se na identificação de antígenos “in situ”, que podem apresentar valor prognóstico e terapêutico (HORTA et al., 2012).

2.4. Enzima ciclooxigenase-2 (COX-2)

A ciclooxigenase (COX) é a primeira oxidase envolvida no processo de produção fisiológica de prostaglandinas (PGs) a partir do ácido araquidônico, tornando-se o principal alvo dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) (HASE et al., 2003). Pode apresentar-se em três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3 (MATSUYAMA; YOSHIMURA, 2009). As PGs e o inibidor da enzima COX podem estar envolvidos na iniciação e/ou na promoção da carcinogênese devido à inibição da COX pela ação das drogas anti-inflamatórias (HASE et al., 2003).

A COX-1 ocorre em tecidos e células e atua na produção de PGs envolvidas na manutenção da homeostasia (DORÉ, 2011; MATSUYAMA; YOSHIMURA, 2009). A COX-2 está envolvida nos processos inflamatórios, proliferação e diferenciação celular e carcinogênese (MATSUYAMA; YOSHIMURA, 2009). Embora a COX-3 tenha sido descrita como o primeiro local de ação dos analgésicos e antipiréticos, seu papel não está bem estabelecido (DORÉ, 2011; MATSUYAMA; YOSHIMURA, 2009).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) inibem a atividade da COX e a produção das PGs, enquanto que estimulam os receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPARs- γ) e inibem a produção de citocinas, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-1 β e Interleucina-6 por intermédio da expressão da PPARs- γ nos leucócitos. Devido a essa inibição,

existem hipóteses de que a enzima COX possa estar envolvida na iniciação e/ou promoção do mecanismo carcinogênico (MATSUYAMA; YOSHIMURA, 2009).

Em humanos, a imunorreatividade da COX-2 é relatada principalmente nas células epiteliais neoplásicas, nas células inflamatórias, no endotélio vascular e em fibroblastos do carcinoma colorretal (LIN et al., 2013). Outras neoplasias que expressam COX-2 nos seres humanos são câncer de mama, pulmão, cabeça, pescoço, pâncreas, próstata e estômago (DORÉ, 2011).

Nos cães, a alta expressão da COX-2 é descrita por Doré (2011) nos carcinomas mamários *in situ*, carcinoma prostático, carcinoma de células transicionais e carcinoma de células escamosas. Pires et al. (2010) observaram marcação de COX-2 mais intensa no melanoma cutâneo, oral e ocular com características de agressividade.

Avaliando o mastocitoma canino, Prada et al. (2012) verificaram expressão de COX-2 em 86% das amostras avaliadas (n=49), sugerindo que os AINES inibidores de COX-2 possam ser de valor terapêutico para essa neoplasia.

Nos tumores de mama em cadelas, De Nardi (2007) verificou maior expressão de COX-2 nas neoplasias malignas, como também maior intensidade de imunorreatividade nas células neoplásicas de lesões malignas.

2.5. MMP-9

Nos últimos anos, a atividade das metaloproteinases tem sido abordada com maior interesse na área da oncologia humana e animal (MANDARA et al., 2009). As metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) são endopeptidases neutras, envolvidas em diversos processos fisiológicos, como a degradação e remodelação da matriz extracelular e da vascularização, e em processos patológicos. A ativação destas enzimas pode provocar doenças como artrites, retinopatia diabética, psoríase e câncer (JOBIM et al., 2008).

A homeostase da matriz extracelular (MEC) é regulada em parte pela atividade equilibrada entre as proteases e os inibidores de proteases (SIU et al., 2003). As MMPs regulam a integridade e a composição da MEC em vários níveis, incluindo a transcrição, ativação e inibição por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). A superprodução de MMPs por interação entre a vascularização tumoral e o sistema linfático pode levar a níveis elevados de MMPs e TIMP, tanto nos tecidos acometidos como em fluidos biológicos, como sangue ou urina (ANGULO et al., 2011).

As MMPs são mediadores cruciais das alterações observadas no microambiente durante a progressão tumoral. São constituintes de uma família de endopeptidases zinco dependentes que exigem clivagem proteolítica para a sua ativação. Essas enzimas possuem efeito regulatório em diversos processos fisiológicos e na sinalização da degradação da matriz extracelular, migração celular, invasão, proliferação e angiogênese (HADLER-OLSEN et al., 2011).

Em um estudo realizado *in vitro*, foram detectados altos níveis de MMP-2 e MMP-9 nas amostras de seminoma, carcinoma embrionário e teratocarcinoma humano em comparação ao tecido testicular normal, correlacionando os achados com um papel determinante das MMPs no fenótipo invasivo dos tumores testiculares (MILIA-ARGEITI et al., 2012).

Nos estudos oncológicos caninos, a MMP-9 já foi detectada no linfoma (ARICÒ et al., 2013), leucemia (ARICÒ et al., 2012), meningioma (MANDARA et al., 2007), mastocitoma (GIANTIN et al., 2012) e carcinoma mamário (SANTOS et al., 2013). Nos tumores de mama, sua expressão ocorre nos tumores de comportamento mais agressivo, sugerindo que as moléculas de MMP-9 podem ser alvo terapêutico durante o período pós-operatório (SANTOS et al., 2013).

2.6. Proteína Ki-67

Recentemente, estudos apontam a avaliação imuno-histoquímica para a obtenção do potencial proliferativo das neoplasias nos animais, através da detecção de proteínas nucleares que se relacionam à replicação do DNA (ZUCCARI et al., 2008).

A Ki-67 é uma proteína nuclear, presente nas fases ativas do ciclo celular, tendo relação direta com a fração de crescimento da população celular (BARRA, 2006). Sua expressão indica estado proliferativo das células neoplásicas, podendo fornecer dados mais consistentes em relação à fração de crescimento tumoral (LEROY et al., 2002).

O índice mitótico obtido através da análise histopatológica indica a fase do ciclo celular, porém é uma análise subjetiva e requer padronização. A análise imuno-histoquímica da proliferação celular permite não só detectar células em mitose, como também a detecção e quantificação de proteínas presentes durante a proliferação celular (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Avaliando a expressão de Ki-67 no carcinoma colorretal humano, foi verificada correlação entre alta expressão de Ki-67 e recidiva da doença (MENEZES et al., 2010). Nos tumores de mama na mulher, os tumores que exibem alta expressão de Ki-67 são mais sensíveis a drogas antineoplásicas (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

A avaliação imuno-histoquímica do seminoma humano revela que o uso da Ki-67 em conjunto com outros marcadores contribui diretamente no estabelecimento do prognóstico do paciente (PECTASIDES et al., 2009). Nos cães, a marcação acentuada de Ki-67 no carcinoma mamário em cadelas e no seminoma indica alto índice proliferativo e o prognóstico desfavorável da doença (CIAPUTA et al., 2012; ZUCCARI et al., 2008). Segundo Pereira et al. (2013), a avaliação imuno-histoquímica de Ki-67 nas neoplasias da glândula perianal nos cães pode fornecer informações ao potencial metastático e auxiliar no diagnóstico dos casos mais complexos.

2.7. p53

A p53 é uma fosfoproteína nuclear que regula a transcrição do DNA, a proliferação e apoptose celular (BARRA, 2006). Acredita-se que uma mutação do gene p53 seja uma alteração muito comum nos casos de malignidades em humanos e em cães, a sua presença esta associada à progressão tumoral (PAPAIOANNOU et al., 2009).

A p53 interrompe o ciclo celular na fase G1, assim que o dano ao DNA da célula é detectado, permitindo então o reparo ao DNA antes da célula entrar na fase S do ciclo celular. Mutações no gene p53 resultam na estabilização da proteína de meia-vida mais prolongada. Dessa forma, a detecção imuno-histoquímica da p53 pode significar a forma mutante da proteína (VARLEY et al., 1991).

Em algumas neoplasias em humanos, como o carcinoma pulmonar, a alta expressão de p53 está relacionada ao comportamento clínico mais agressivo do tumor (VARLEY et al., 1991). No carcinoma gástrico humano, a imunorreatividade do gene p53 correlaciona-se com os parâmetros de agressividade e prognóstico desfavorável (CARRASCO et al., 2011).

Assim como no homem, a p53 é detectada nas células germinativas do testículo de cães normais (PAPAIOANNOU et al., 2009; VITELOZZI et al., 1998). Em um estudo realizado por Papaioannou et al. (2009) a expressão de p53 nas espermatogônias e espermatócitos primários sugere a expressão da proteína durante a divisão meiótica dessas células.

2.8. Objetivos

2.8.1. Objetivo geral

Visto o aumento da preocupação com o bem-estar dos animais senis e a maior susceptibilidade desses animais às neoplasias malignas, este estudo teve como objetivo caracterizar a expressão de Ki-67, COX-2, MMP-9 e p53 nas neoplasias testiculares caninas.

2.8.2. Objetivos específicos

- Verificar a relação entre o padrão histológico e raça, idade e posicionamento testicular.
- Verificar a correlação entre o índice mitótico e a expressão de Ki-67.
- Verificar a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos em questão nas diferentes neoplasias testiculares caninas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção das amostras

Foram selecionadas 50 amostras de neoplasia testicular canina do Serviço de Patologia Veterinária da FMVA – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular “VetPat” de Campinas. As amostras foram obtidas de fragmentos de testículos provenientes de castrações eletivas ou terapêuticas mantidas em blocos de parafina. O prontuário de cada animal foi verificado para obter informações como raça, idade e posicionamento testicular.

Como critérios de seleção das amostras, incluiu-se a preservação histológica dos tecidos, ausência de áreas de necrose e presença do histórico após a cirurgia. Nos casos que apresentaram mais de um tipo tumoral ou o mesmo tipo de tumor nos dois testículos, as neoplasias foram avaliadas individualmente.

Para cada amostra selecionada, foram realizados cortes histológicos (4 μ m) corados com hematoxilina e eosina (HE) ou submetidos a análise imuno-histoquímica. Os cortes corados por HE foram observados nas objetivas de 20X e 40x, para reclassificação histológica de acordo com Kennedy et al. (1998), bem como a obtenção do índice mitótico. Este foi comparado ao índice de expressão do anticorpo anti-Ki-67. Para obtenção do índice mitótico foram contadas as figuras de mitose em 10 campos escolhidos de forma aleatória, sob a objetiva de 40X, obtendo-se uma média do número de mitose por neoplasia (GRIECO et al., 2007).

3.2. Imuno-histoquímica

Para as reações de imuno-histoquímica, foram preparados cortes com 4µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâmina silanizada (STARFROST®). As reações de imuno-histoquímica seguiram em linhas gerais o protocolo segundo HSU et al. (1981), com adaptações. Os anticorpos primários utilizados e suas diluições estão descritos no Quadro 1. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol em 50% por 40 minutos. Para bloqueio das ligações inespecíficas utilizou solução de leite em pó desnatado a 3% por 30 minutos para Ki-67 e Protein Block (DAKO, X0909). A incubação foi de 10 minutos para COX-2, MMP-9 e p53. Os anticorpos primários foram incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C. O anticorpo secundário biotinilado (DAKO, K0690) foi adicionado aos cortes e incubado por 45 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. Após a lavagem, foi aplicado o complexo streptoavidina-peroxidase LSAB (DAKO, K0690) também por 45 minutos em câmara úmida e temperatura ambiente. A lavagem padrão em Tampão Salino Fosfato (PBS) 7,2 – 7,4 foi realizada em 3 séries de 5 minutos cada, exceto após o bloqueio dos sítios específicos.

O Revelador Diaminobenzidina (DAB) (DAKO, K3468) foi empregado para os anticorpos nucleares Ki-67 e p53, caracterizando como positivas as áreas nucleares coradas em marrom. Já o Revelador Etilcarbazol (AEC) (DAKO, K3461) foi aplicado para os anticorpos MMP-9 e COX-2, de localização citoplasmática, mostrando em vermelho as áreas positivas, possibilitando a diferenciação entre áreas positivas (em vermelho) do pigmento marrom característico das células intersticiais (FOSTER, 2007).

Para controle positivo das reações, utilizou-se linfonodo canino para o anticorpo Ki-67, seminoma canino para o anticorpo p53, carcinoma de células transicionais canino para o anticorpo COX-2 e carcinoma mamário canino para o anticorpo MMP-9, de acordo com a indicação de seus respectivos fabricantes.

Quadro 1 - Relação dos anticorpos primários, diluição, clone, marca do anticorpo, recuperação antigênica, cromógeno e contra-coloração utilizados nas reações de imuno-histoquímica nos tumores testiculares caninos

Anticorpo	Diluição	Clone	Espécie	Fabricante	Recuperação antigênica	Contra-coloração
Ki-67	1:25	MIB1	Camundongo	DAKO	Tris EDTA ⁽¹⁾ em panela a vapor ⁽²⁾	Hematoxilina Harris
P53	1:50	DO-7	Camundongo	DAKO	Tris EDTA ⁽¹⁾ em panela de pressão ⁽³⁾	Hematoxilina Harris
COX-2	1:100	CX-294	Camundongo	DAKO	Citrato ⁽⁴⁾ em panela de pressão ⁽³⁾	Hematoxilina Mayer
MMP-9	1:400	562A4	Camundongo	Millipore	Citrato ⁽⁴⁾ em panela de pressão ⁽³⁾	Hematoxilina Mayer

(1) Tris EDTA: pH 9,0 com acréscimo de Tween 20 (DAKO).

(2) Panela a vapor: solução pré-aquecida por 20 minutos. Incubação por 30 minutos em vapor.

(3) Panela de pressão: incubação por 10 minutos a 110°C.

(4) Solução Citrato de Sódio (pH 6,0) diluído 1:10 (Dako, S1699).

3.3. Análise de imagem

Os cortes histológicos foram avaliados e fotomicrografados com o auxílio de um sistema de análise de imagem computadorizada, utilizando-se o *software* de análise de imagens Image ProPlus 6.1 (Media Cybernetics). Foram capturadas imagens de 10 campos “*hot spots*” em objetiva de 40x em microscopia de luz no microscópio Olympus BX-61. Os campos “*hot spots*” correspondiam às áreas onde era possível observar o maior número de células positivas para o anticorpo em questão. Foram evitadas áreas com necrose e infiltrado inflamatório, com exceção das neoplasias diagnosticadas como seminoma, onde a presença do infiltrado linfocitário é uma das características morfológicas observadas para diagnóstico desse tipo tumoral.

3.4. Análise estatística

Os valores obtidos com o programa de análise de imagem foram avaliados de acordo com a classificação histopatológica das neoplasias. Para isso foi utilizado o software Prism 6.3 (GraphPad, La Jolla, USA), empregando o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Comparação Múltipla de Dunn, considerando significativos os valores de $p < 0,05$ para análise entre os grupos, e o Teste de Spearman para correlação entre o índice mitótico e marcação de Ki-67. Os dados foram expressos pela mediana e pelo intervalo interquartil.

4. RESULTADOS

4.1. Histórico dos animais

A idade dos animais variou entre 6 a 16 anos de idade, com média de 10 anos. Os cães sem raça definida (n=10, 20%) apresentaram maior frequência de neoplasias testiculares, seguidos pelas raças Poodle (n=7, 14%), Labrador e Boxer (n=5, 10%). Os cães da raça Cocker e Pinscher apresentaram frequência de 8% cada (n=4/raça), enquanto que as raças Pastor Alemão (n=3, 6%), Fila Brasileiro, Rottweiler, Pitbull e Pinscher foram menos acometidas (n=2/raça, 4%) neste estudo.

Dentre os animais avaliados, 20,6% apresentaram histórico de testículo ectópico. Em relação à classificação, 75% dos animais ectópicos foram diagnosticados com sertolioma (n=6), enquanto que os outros dois animais apresentaram leydigocitoma e seminoma cada um (n=1, 12,5%). Os dados completos dos animais estão descritos no Quadro 2.

Dos 50 animais avaliados, 31 possuíam histórico sobre a qualidade de vida. A partir desse número, verificamos que 48,4% estavam vivos. Nos casos de óbito, 43,7% foram por causa desconhecida, 25% foram pelo desenvolvimento de outras neoplasias, como o melanoma (n=2) e mastocitoma (n=1), 18,7% por insuficiência renal crônica e um por insuficiência cardíaca.

4.2. Características histopatológicas

O grupo de tumores testiculares avaliados foi composto por 38% leydigocitoma (n=22), 38% seminoma (n=22) e 22% de sertolioma (n=12).

De acordo com a subclassificação (KENNEDY et al., 1998), o seminoma foi dividido em 68% do tipo difuso (n=15), 27% difuso e intratubular (n=6) e uma amostra composta pelo tipo intratubular, representando 5% do total de amostras. O tipo intratubular foi caracterizado pela presença de células

germinativas neoplásicas no interior de túbulos seminíferos atróficos septados por tecido conjuntivo delicado e raras ilhas de linfócitos no estroma. As células exibiam citoplasma escasso arredondado, núcleo central com cromatina grosseira e nucléolos proeminentes. Por vezes foram observadas células multinucleadas, bem como anisocariose e anisocitose em graus variados (Figura 1B). O seminoma difuso mostrou células germinativas neoplásicas dispostas em lóbulos, folhas ou cordões, formando áreas mais sólidas na periferia e menos densas no centro da neoplasia. As células exibiam citoplasma arredondado ou poliédrico, núcleo central com cromatina grosseira e múltiplos nucléolos proeminentes. Observou-se pleomorfismo celular variando de moderado a acentuado associado ou não a figuras de mitose atípicas e ainda pequenas ilhas de linfócitos dispostas de forma multifocal (Figura 1A).

Os sertoliomas exibiram células em arranjo tubular, perpendiculares a membrana basal, mostrando citoplasma amplo alongado, núcleo oval a fusiforme e nucléolo proeminente. Foram observadas raras figuras de mitose e anisocitose moderada. Os túbulos, em sua maioria eram separados por estroma denso abundante, por vezes hialinizado.

O leydigocitoma foi representado por 64% angiomatoide (n=14), 23% pseudoadenomatoso (n=5), 9% sólido-difuso (n=2) e 4% angiomatoide e pseudoadenomatoso (n=1). No tipo pseudoadenomatoso eram formados grandes grupos de células que frequentemente circundavam fluido em quantidade acentuada, além da presença de pequenos vasos e capilares (Figura 2A). No tipo angiomatóide, as células formavam pequenos cordões de células amplas, por vezes circundando um fluido róseo (Figura 2B). Já no tipo sólido-difuso, as células se organizavam em pequenas folhas ou cordões septadas por um tecido conjuntivo delicado (Figura 2C). As células mostravam citoplasma amplo, frequentemente com pigmento amarelado em quantidade discreta a moderada e vacúolos abundantes. Núcleo periférico pequeno, hipercromático, nucléolo por vezes proeminente e ausência ou raras figuras de mitose.

Quadro 2 - Relação de casos de acordo com a classificação histopatológica, raça, índice mitótico, idade e posicionamento testicular das neoplasias testiculares caninas

Paciente	Classificação Histopatológica	Índice Mitótico	Raça	Idade	Posicionamento testicular
1	Seminoma difuso	4,6	Basset Hound	11	Bolsa escrotal
2		2,1	Boxer	7	Ectópico
3		0,3	Cocker	11	-
4		0,8	Fila Brasileiro	10	-
5		1,8	Pastor Alemão	7	-
6		0,1	Pastor Alemão	10	-
7		1,3	Pinscher	11	-
8		2,3	Poodle	12	Bolsa escrotal
9		0,5	Poodle	12	Bolsa escrotal
10		0,1	SRD	9	-
11		0,3	SRD	10	-
12		1,9	SRD	11	-
13		1,9	SRD	14	-
14		1,6	Yorkshire	8	-
15	Seminoma intratubular	2,0	Rottweiler	7	Bolsa escrotal
16	Seminoma difuso e intratubular	0,7	Cocker	9	Bolsa escrotal
17		0,8	Labrador	11	Bolsa escrotal
18		2,3	Labrador	12,5	Bolsa escrotal
19		1,5	Poodle	12	Bolsa escrotal
20		2,4	Shihtzu	11	Bolsa escrotal
21	1. Seminoma difuso 2. Seminoma intratubular	1,1(1) 0,5(2)	Boxer	9	Bolsa escrotal
22	Leydigocitoma angiomatoide	0,3	Boxer	12	Bolsa escrotal
23		2,8	Fila Brasileiro	12	Bolsa escrotal
24		0,2	Golden Retriever	6	Bolsa escrotal
25		0,7	Labrador	11	Bolsa escrotal
26		0,2	Pastor Alemão	10	-
27		0,6	Pastor Belga	9	Bolsa escrotal
28		0	Pitbull	8	Bolsa escrotal
29		0,1	Poodle	15	-
30		0	SRD	9	Bolsa escrotal
31		0,3	SRD	11	-
32		0	SRD	14	-
33		0	SRD	14	Bolsa escrotal
34	Leydigocitoma pseudoadenomatoso	0	Boxer	7	Ectópico
35		0,4	Pinscher	11	Bolsa escrotal
36		1,3	Schnauzer	6	-
37	Leydigocitoma sólido-difuso	0	Pinscher	7	Bolsa escrotal
38		0,1	Pitbull	8	Bolsa escrotal

39	Leydigocitoma angiomatoide e pseudoadenomatoso	0	Cocker	12	Bolsa escrotal
40	1 e 2. Leydigocitoma angiomatoide	0,1 (1 e 2)	SRD	9	Bolsa escrotal
41	1 e 2. Leydigocitoma pseudoadenomatoso	0 (1 e 2)	Rottweiler	9	Bolsa escrotal
42	Sertolioma	0,6	Boxer	7	Ectópico
43		3,8	Labrador	10	Bolsa escrotal
44		0	Poodle	10	Ectópico
45		0	Poodle	10	Ectópico
46		1	Poodle	13	Ectópico
47		0	SRD	10	Bolsa escrotal
48	1 e 2. Sertolioma	0,1(1)/0,8(2)	Cocker	7	Ectópico
49		1,1(1)/0,9(2)	Labrador	7	Bolsa escrotal
50		0,9(1)/0,8(2)	Pinscher	16	Ectópico

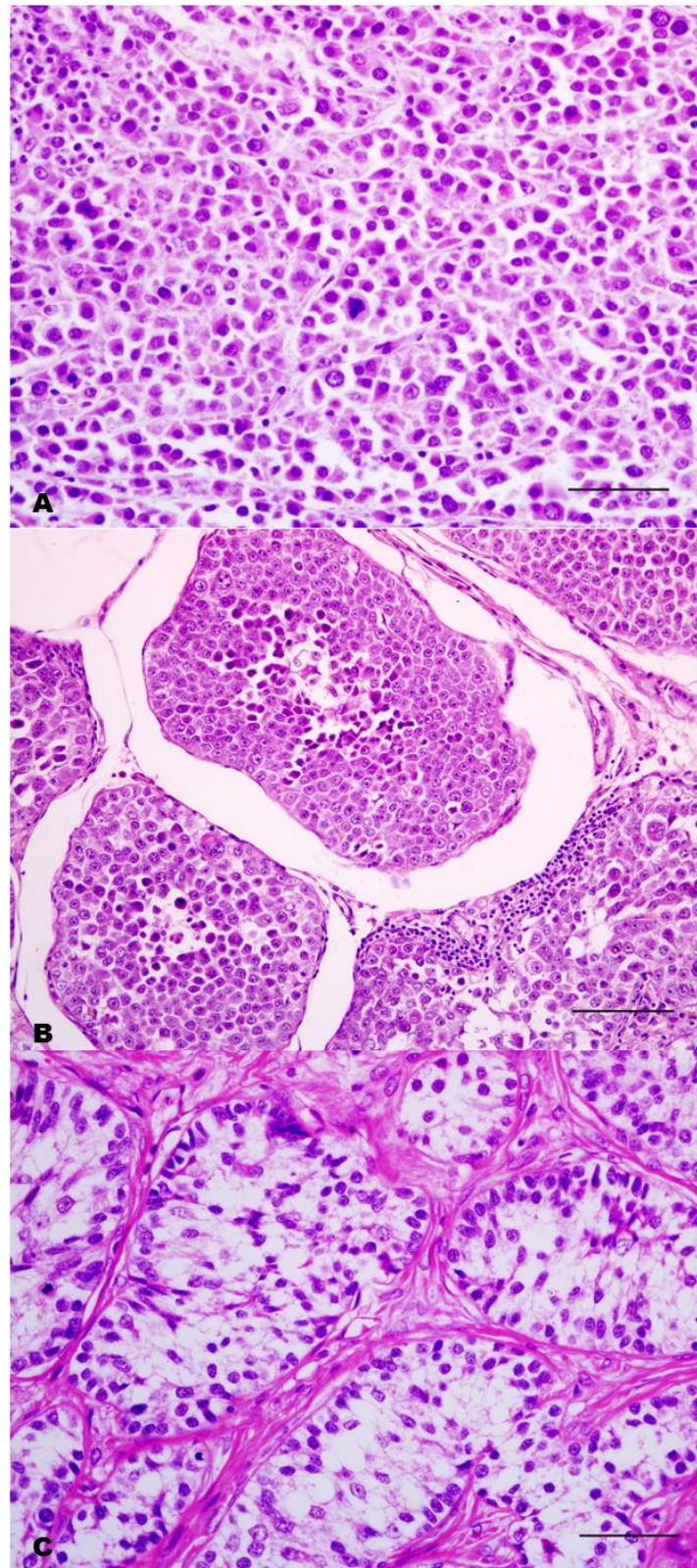


FIGURA 1 – Fotomicrografias de neoplasias testiculares caninas. **A:** Seminoma difuso. **B:** Seminoma intratubular. **C:** Sertolioma. (HE – Barra = 50µm).

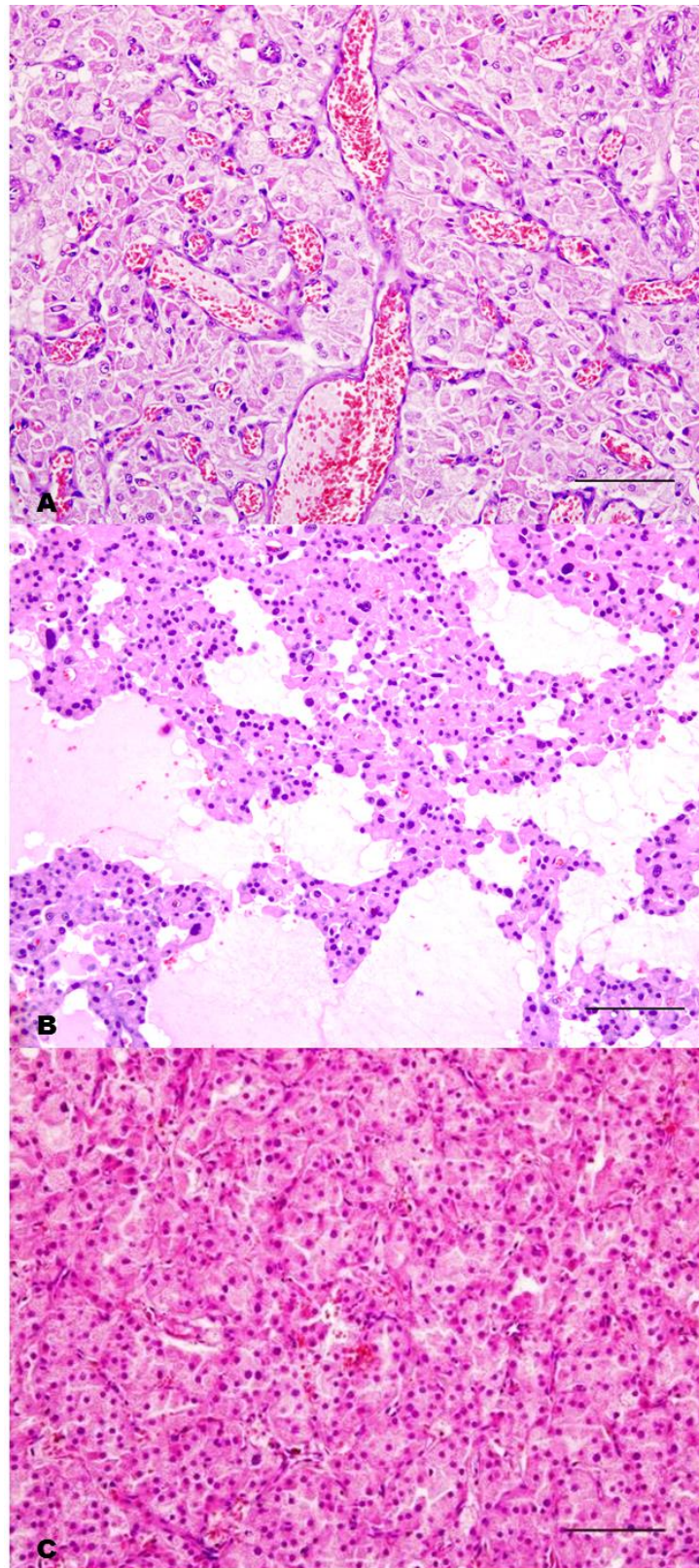


FIGURA 2 – Fotomicrografias de neoplasias testiculares caninas. **A:** Leydigocitoma pseudoadenomatoso. **B:** Leydigocitoma angiomatose. **C:** Leydigocitoma sólido-difuso. (HE – Barra = 100µm).

4.3. Características imuno-histoquímicas

A expressão nuclear da proteína Ki-67 foi mais intensa nos seminomas, com 2,9% de área nuclear positiva, enquanto que os sertoliomas e os tumores classificados como leydigocitoma mostraram respectivamente 0,7 e 0,5 % de células com núcleos marcados (Figura 3). Não houve correlação significativa entre o índice mitótico avaliado na HE e a marcação imuno-histoquímica para a Ki-67 para as neoplasias estudadas (leydigocitoma $p=0,9937$, sertolioma $p=0,878$ e seminoma $p=0,2131$) (Figura 8).

A imunorreatividade para a COX-2 foi detectada no citoplasma das células neoplásicas e variou de moderada a intensa, distribuída de forma difusa ou multifocal. A expressão da COX-2 foi observada em maior número de células no leydigocitoma, que mostrou 4,2% células positivas, do que nos seminomas com 0,9% e nos sertoliomas 0,6% (Figura 4).

A avaliação dos cortes imunomarcados para MMP-9 mostrou marcação intracitoplasmática intensa em poucas células neoplásicas (Figura 5 A e B). O seminoma mostrou maior expressão para MMP-9 em relação ao leydigocitoma e o sertolioma. O padrão de marcação exibido no seminoma foi principalmente perivascular e próximo ao infiltrado linfocitário.

Em relação à imunoexpressão de p53, foram observados 2,1% de área nuclear positiva no seminoma (Figura 5C), enquanto que o leydigocitoma e o sertolioma apresentaram poucas células marcadas.

As porcentagens de área marcada para os anticorpos Ki-67, COX-2, MMP-9 e p53 estão descritos na Figura 6. Não houve diferença significativa entre os subtipos das neoplasias para os diferentes anticorpos avaliados ($p>0,05$). Porém, foi observada maior expressão de MMP-9 e p53 no seminoma difuso do que no tipo intratubular. Os resultados estão descritos na Figura 7.

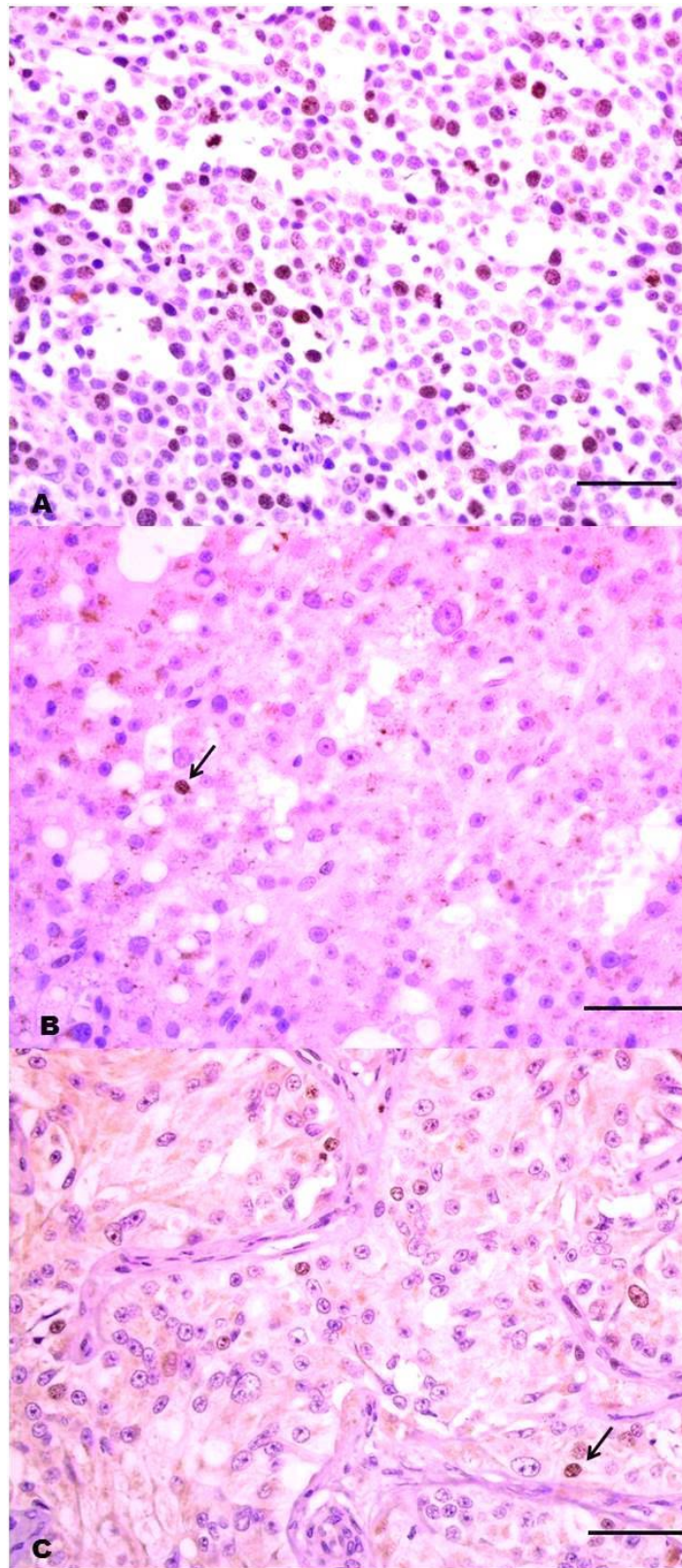


FIGURA 3 – Fotomicrografias de neoplasias testiculares caninas marcadas para Ki-67, reveladas com DAB. **A:** Seminoma. Expressão acentuada dos núcleos e distribuição difusa. **B:** Leydigocitoma. Um único núcleo de célula Ki-67 positiva (*). **C:** Sertolioma. Notam-se células positivas para Ki-67, distribuídas de forma homogênea (*). (Barra = 50µm).

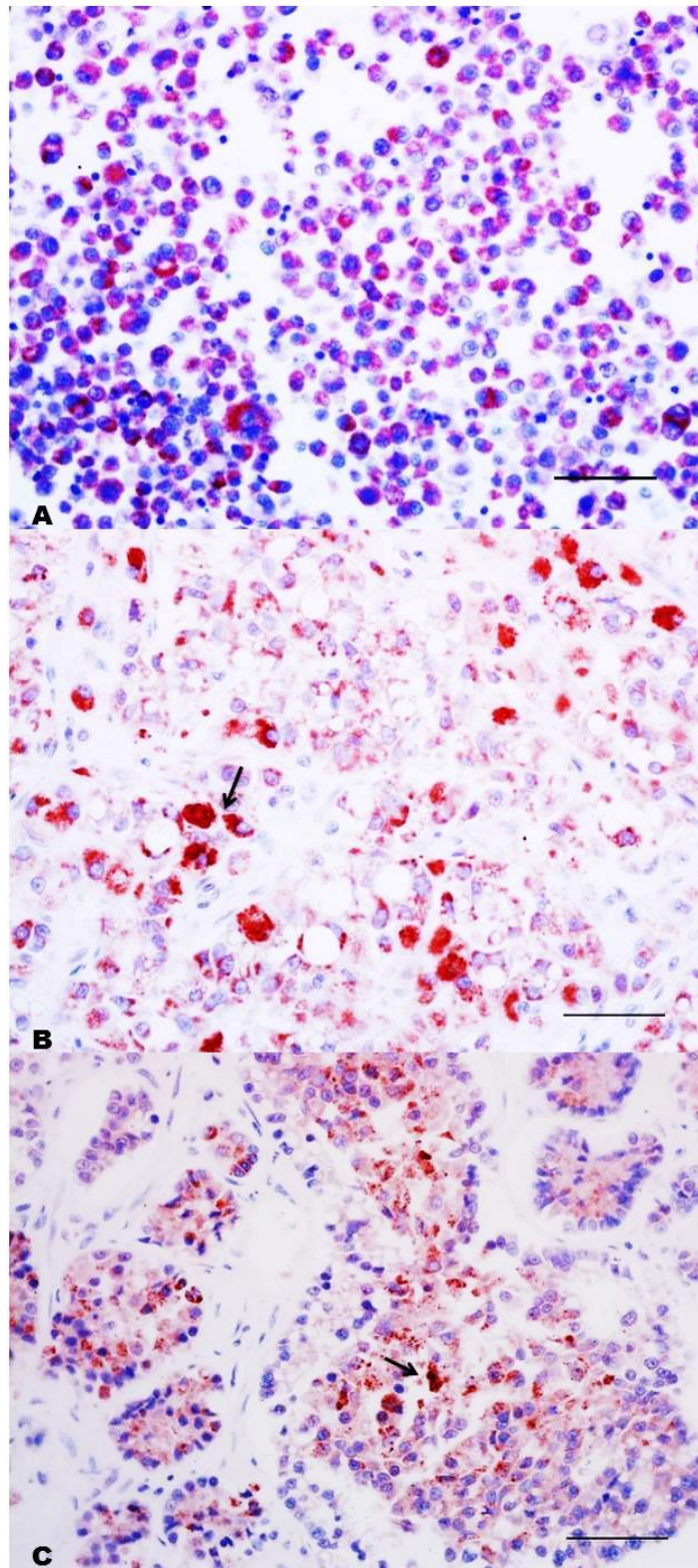


FIGURA 4 – Fotomicrografias de neoplasias testiculares caninas marcadas para COX-2, reveladas com AEC. **A:** Seminoma. Citoplasma das células germinativas neoplásicas com marcação positiva variando de moderada e difusa. **B:** Leydigocitoma. Nota-se marcação citoplasmática acentuada em células multifocais (*). **C:** Sertolioma. Expressão acentuada em raras células (*). (Barra = 50µm).

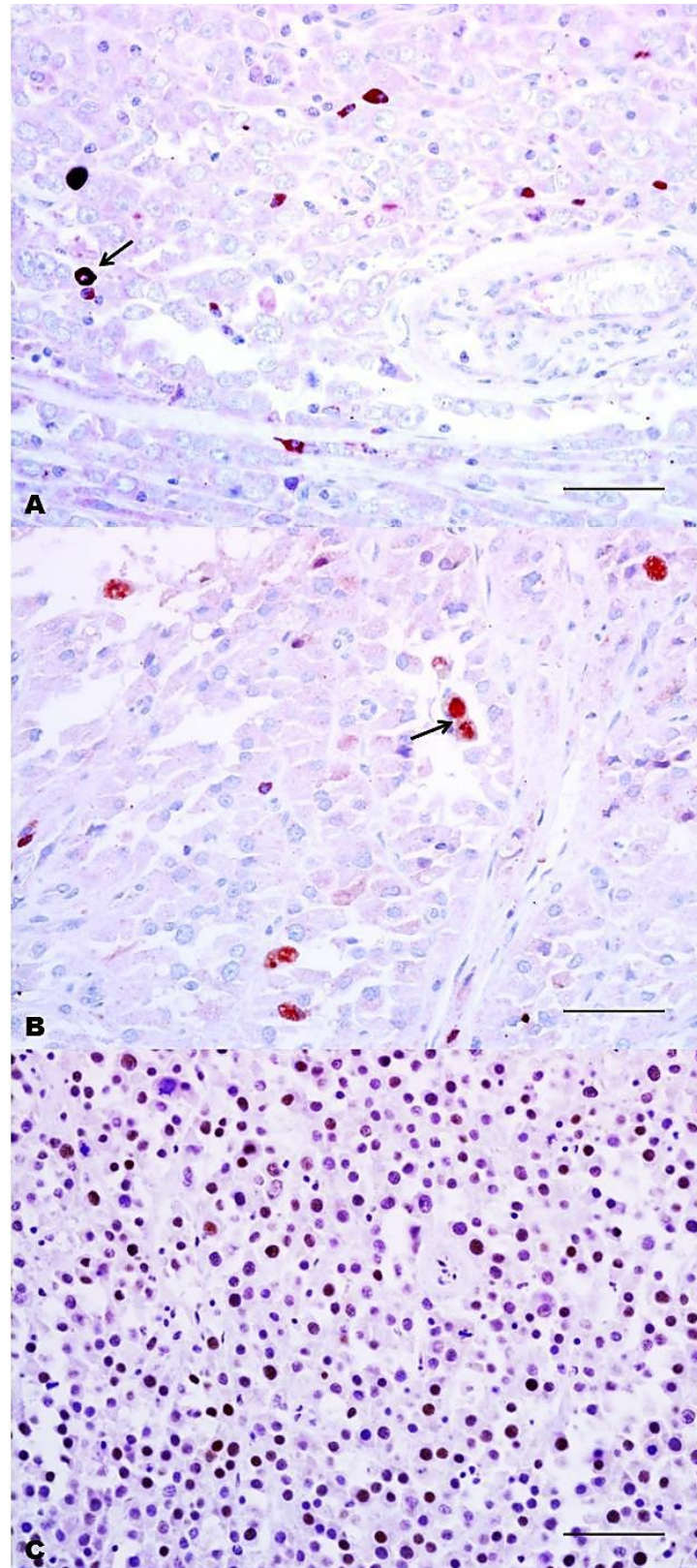


FIGURA 5 – Fotomicrografias de neoplasias testiculares caninas marcadas para MMP-9 e p53. **A:** Seminoma. **B:** Leydigocitoma. Nota-se expressão citoplasmática acentuada de MMP-9 em células multifocais em A e B. (*) (Revelador AEC). **C:** Seminoma. Marcação nuclear acentuada e difusa para p53 (Revelador DAB). (Barra = 50µm).

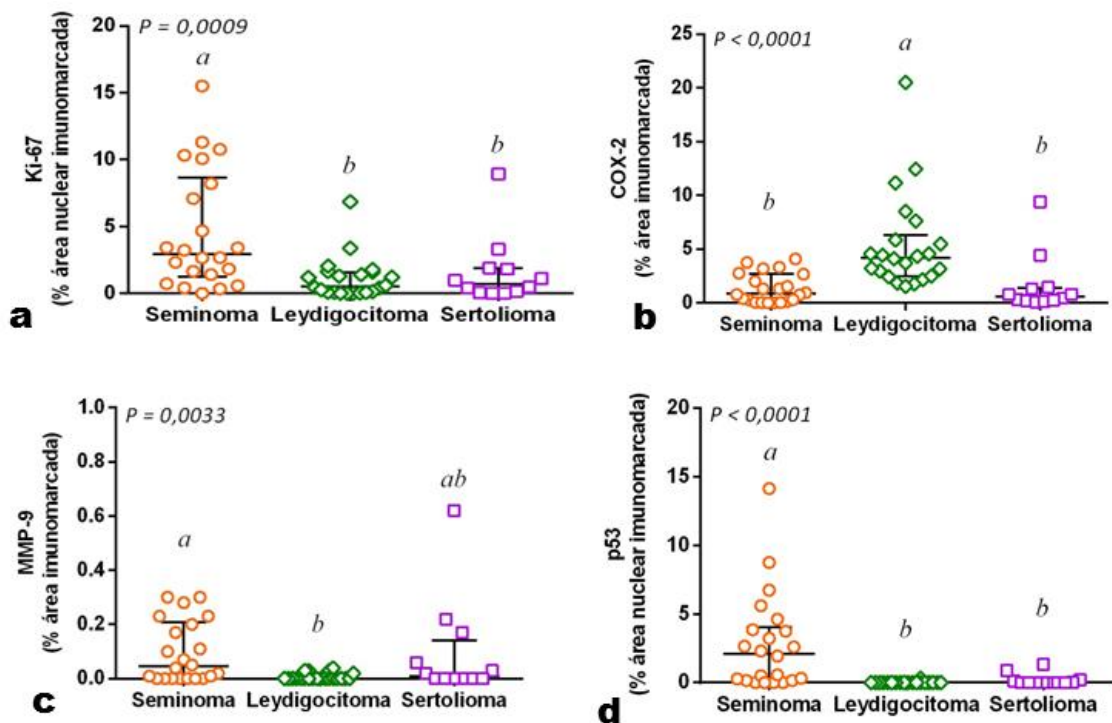


FIGURA 6: Avaliação dos marcadores de prognóstico Ki-67 (a), COX-2 (b), MMP-9 (c) e p53 (d) nas neoplasias testiculares do cão, seminoma, leydigocitoma e sertolioma (Teste de Kruskal Wallis). As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil. ^{ab} grupos com letras distintas diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

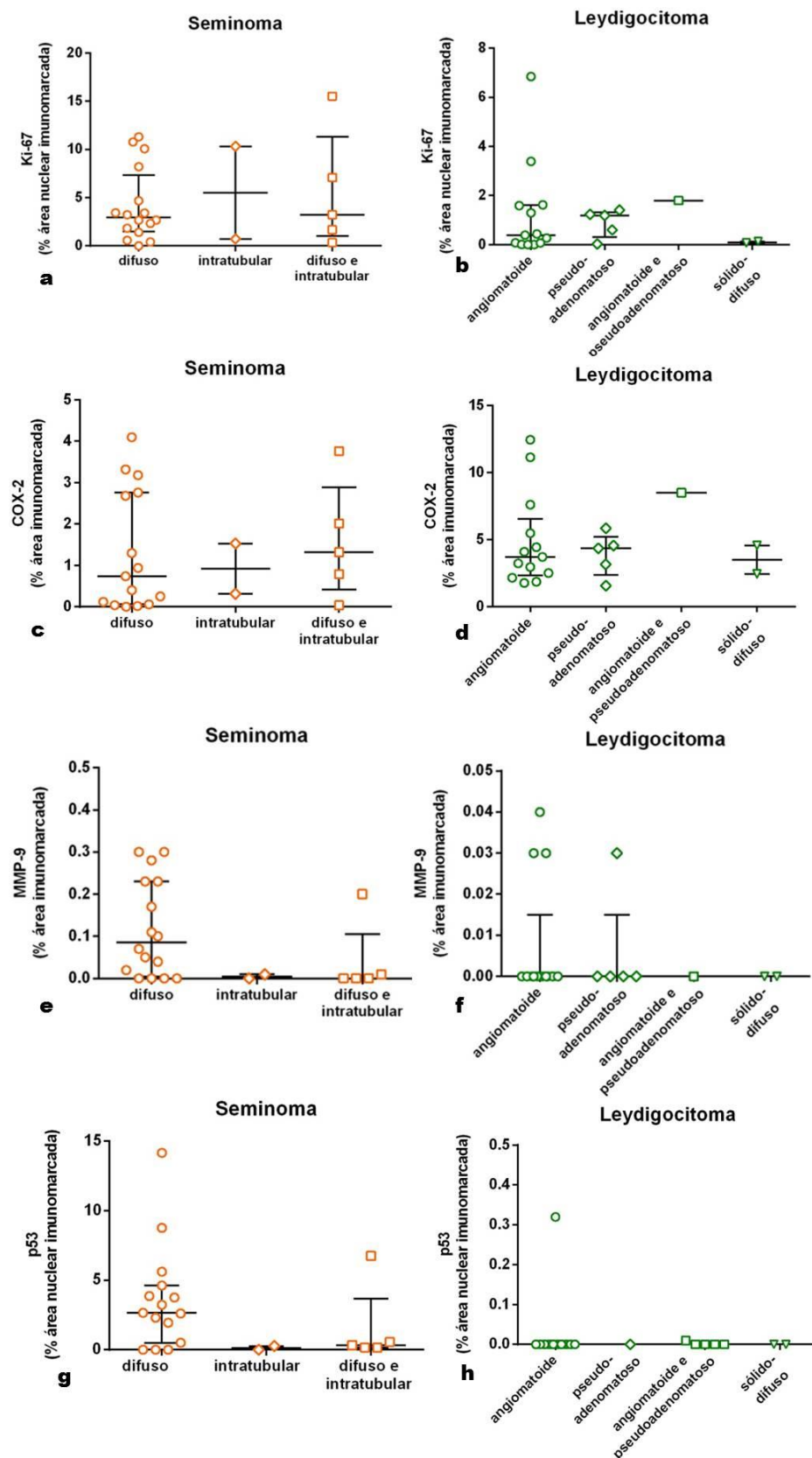


FIGURA 7: Avaliação dos marcadores de prognóstico Ki-67 (a,b), COX-2 (c,d), MMP-9 (e,f) e p53 (g,h) nos subtipos das neoplasias testiculares do cão, seminoma e leydigocitoma (Teste de Kruskal Wallis). As linhas horizontais indicam a mediana e o intervalo interquartil.

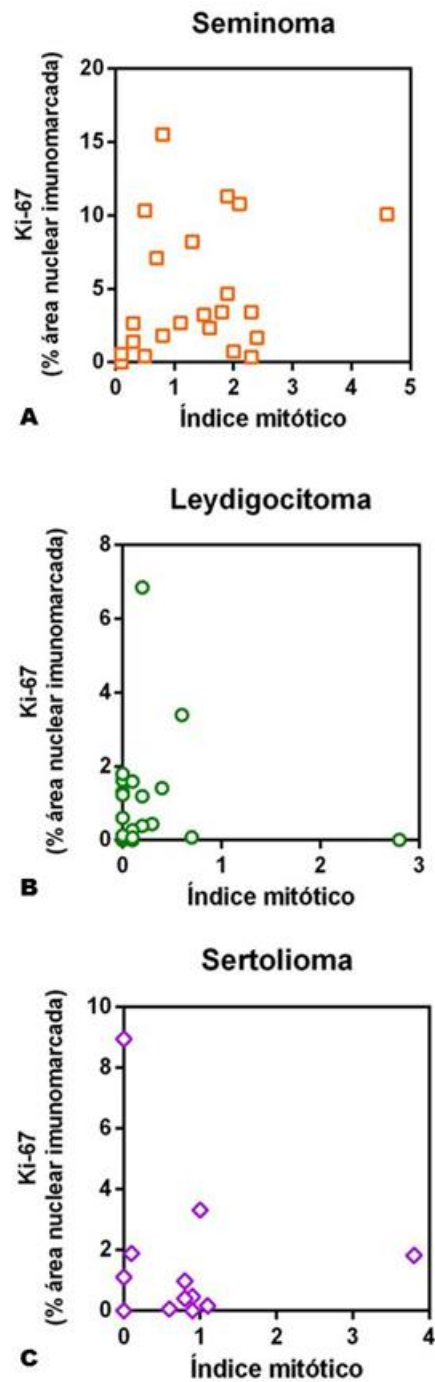


FIGURA 8: Não existe correlação entre a marcação positiva da Ki-67 e o índice mitótico.

5. DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento dos cães aumenta a predisposição para a ocorrência de doenças, principalmente às neoplasias (FREITAS et al., 2006). No Brasil, as neoplasias estão entre as principais causas de óbito e de eutanásia em cães e gatos, fato que tem ganhado relevância na medicina veterinária e desafiando a área para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e medidas profiláticas mais acuradas (BODER et al., 2013; COOLEY et al., 2003; D'ANGELO et al., 2012; FIGHERA et al., 2008; FREITAS et al., 2006; TRAPP et al., 2010).

No presente estudo, a média de idade dos cães acometidos com neoplasia testicular foi de 10 anos, semelhante aos estudos realizados por Liao et al. (2009) e Nødtvedt et al. (2011). Grieco et al. (2008) observaram que a idade média dos animais acometidos era de 10,7 anos, sem que ocorresse associação entre idade e o tipo tumoral desenvolvido.

Avaliando as raças individualmente, os cães sem raça definida mostraram prevalência mais alta, seguido pelos cães da raça Poodle. Porém, quando avaliada a frequência das neoplasias em relação ao porte das raças, verificamos que as raças de grande porte representaram 42% das amostras. Esse dado confirma os achados da literatura de que os cães de grande porte são mais predispostos ao desenvolvimento de tumor testicular (GRIECO et al., 2008; NØDTVEDT et al., 2011).

No presente estudo, dos oito casos de testículo ectópico, seis ocorreram em cães das raças Poodle e Boxer (n=3, cada um). São escassos os dados da literatura sobre a associação entre raça, criptorquidismo e neoplasia testicular nos cães. Em Taiwan, os cães da raça Maltês mostraram ser mais os mais predispostos a essa associação, seguido pelos cães da raça Poodle (LIAO et al., 2009).

Em estudo realizado na Noruega, foi verificada predominância de sertolioma em cães da raça Collie e Pastor de Shetland, enquanto que nos

cães da raça Norwegian Elkhound houve maior frequência de seminoma (NØDTVEDT et al., 2011). Nas amostras deste estudo não foi observada diferença na frequência dos tipos tumorais entre as diferentes raças.

Sabe-se também que cães criptorquidas são mais predispostos ao desenvolvimento de neoplasia testicular (MEYERS-WALLEN, 2012), principalmente os seminomas e os sertoliomas (KENNEDY et al., 1998, YU et al., 2009). No presente estudo, houve predominância do sertolioma nos testículos ectópicos, diferindo dos resultados obtidos por D'Angelo et al. (2012) e Liao et al. (2009), que observaram o seminoma como o tipo neoplásico mais frequente.

A análise da classificação histológica das neoplasias testiculares de cão neste estudo revelou frequência semelhante dos seminomas e dos leydigocitomas (39%). De acordo com a literatura, o leydigocitoma é o tipo neoplásico mais observado nos cães, seguido pelo seminoma e sertolioma (MORRIS; DOBSON, 2001; REIF, 2007). Grieco et al. (2008) e Nødtvedt et al. (2011) observaram maior frequência de leydigocitomas enquanto que Liao et al. (2009) verificaram frequência de 34,3% dos seminomas.

A avaliação da subclassificação dos seminomas e dos leydigocitomas ainda é pouco realizada (CIAPUTA et al., 2012; D'ANGELO et al., 2012; GRIECO et al., 2008; KIM et al., 2010). No presente estudo, observamos predominância do seminoma difuso em relação ao seminoma intratubular, diferente dos resultados de Grieco et al. (2008), em que o seminoma intratubular foi mais frequente. Muitos estudos avaliam os seminomas caninos de acordo com a classificação utilizada para o homem. Segundo os autores, o comportamento clínico benigno do seminoma no cão pode ser explicado pela semelhança do seminoma difuso canino ao seminoma espermatocítico do homem, que é derivado de uma linhagem de células germinativas mais diferenciadas (KIM et al., 2010; MAIOLINO et al., 2004).

Em relação à subclassificação dos leydigocitomas, o tipo angiomatoide foi mais frequente, seguido pelo pseudoadenomatoso e sólido-difuso. De acordo com a literatura, os leydigocitomas exibem comportamento benigno,

não oferecendo risco aos cães, independente do tipo histológico (FAN e LORIMIER, 2007; FOSTER; LADDS, 2007; KENNEDY et al., 1998).

Os seminomas apresentaram intensa marcação nuclear ao anticorpo para Ki-67, caracterizando as células que estão se preparando para entrar em divisão (CIAPUTA et al., 2012; PAPANOIANNIOU et al., 2009). A quantidade elevada de figuras de mitose neste tipo neoplásico associada à expressão elevada de Ki-67 mostra correlação positiva com uma evolução e prognóstico desfavoráveis (GALLEGOS et al., 2003). Esses dados da literatura se assemelham com os resultados aqui apresentados. Quando comparado com o índice mitótico verificado no seminoma, a imunodeteção da proteína Ki-67 mostrou ser método mais eficaz para observar as células em proliferação. Este dado indica que a utilização da expressão de Ki-67 pode ser usada como uma possível ferramenta prognóstica para os seminomas.

O leydigocitoma apresentou menor área de células marcadas para Ki-67, contrapondo à expressão da COX-2 que foi mais evidente neste tipo de tumor. Sabe-se que a COX-2 está envolvida em diversos processos, como a inflamação e proliferação celular, e mostra atividade reduzida em células normais. Entretanto, a atividade está aumentada nos tecidos como resposta aos diferentes estímulos, como TNF, interleucina 1 (IL-1) ou ainda por agentes cancerígenos, como a TPA (acetato de tetradecanoilforbol) ou por estímulo hormonal (HASE et al., 2003; SIRIANNI et al., 2009). Portanto, pode-se sugerir o papel da COX-2 no controle da proliferação das células de Leydig neoplásicas.

São poucos os dados na literatura sobre o valor prognóstico da COX-2 nas neoplasias humanas, principalmente nos tumores de células germinativas (PECTASIDES et al., 2009). Estudos experimentais revelaram que a expressão de COX-2 no leydigocitoma humano e em ratos se deve pela ligação da prostaglandina E2 (PGE2) aos receptores EP4, à proteína quinase A e na proteína de fosforilação da resposta cAMP (CREB). Esses receptores por sua vez diminuem a expressão de aromatase, que reduz a produção de estrógeno e a expressão da Ciclina E, resultando na diminuição da proliferação das

células de Leydig neoplásicas (SIRIANNI et al., 2009). Portanto, a menor quantidade de células marcadas para Ki-67 deve ser resultado da elevada expressão da proteína COX-2 nestas células. De forma inversa, os seminomas apresentaram menor expressão da COX-2 e elevada expressão de Ki-67, confirmando os resultados experimentais obtidos anteriormente (SIRIANNI et al., 2009), onde a COX-2 parece modular a proliferação das células de Leydig.

Em relação à expressão de MMP-9, verificamos maior marcação nas amostras de seminoma do que as de leydigocitoma e sertolioma. Em seres humanos, foi observada maior expressão de MMP-2 e MMP-9 no teratocarcinoma não seminomatoso e embrionário, neoplasias que exibem comportamento mais agressivo do que no seminoma com baixo potencial de invasão. Tal fato chama atenção para a importância das MMPs no processo de invasão das neoplasias testiculares, sugerindo o uso das MMPs como biomarcadores de malignidade para a neoplasia (MILIA-ARGIETI et al., 2012).

O processo de ativação das MMPs ocorre pelo estímulo de algumas substâncias como a IL-1, fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento derivado de plaquetas (ESTÈVE et al., 2002). A IL-1, por sua vez é ativada pelos linfócitos, células inflamatórias que participam da composição do seminoma humano e canino (GRIECO et al., 2004). Portanto, a expressão mais acentuada da MMP-9 próxima ao infiltrado linfocitário do seminomas pode ser explicada pela ativação da IL-1 através dos linfócitos que compõem esse tipo neoplásico, estimulando então a produção de MMP-9.

Poucos pesquisadores avaliam o papel da p53 como marcador prognóstico de tumores testiculares em humanos (ADDEO et al., 2007; MAZUMDAR et al., 2003). Pectasides et al. (2009) observaram baixa expressão de p53 em 73% dos tumores de célula germinativa, porém 27% dos tumores mostraram entre 15% a 70% de positividade. No presente estudo, apenas os seminomas mostraram forte expressão para p53 enquanto que as outras neoplasias exibiram pouca marcação ou ausente, provavelmente pelo comportamento benigno destas neoplasias.

O clone DO-7 da p53 detecta tanto a forma típica como a proteína mutante da p53. Essa característica não influencia nos resultados, pois a mutação de p53 nas neoplasias testiculares no homem é rara (GUILLOU et al., 1996). Semelhante aos resultados observados no presente estudo, Papaioannou et al. (2009) verificou maior expressão de p53 nas amostras de seminoma canino, sugerindo influencia dessa proteína na sobrevida dos cães com esse tipo neoplásico.

O seminoma difuso mostra comportamento mais agressivo do que o tipo intratubular, indicando potencial de malignidade dessas neoplasias (VITELLOZZI et al., 1998). O trabalho de Papaioannou et al. (2009) relata que a expressão de p53 foi mais evidente nas amostras de seminoma difuso do que as amostras de seminoma intratubular, fato também observado no presente estudo. Porém, são necessários estudos com maior número de amostras de seminoma com diferentes classificações histológicas para a obtenção de resultados estatisticamente significativos.

6. CONCLUSÃO

A marcação imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, MMP-9 e p53 em células neoplásicas foi numerosa nos seminomas, estando de acordo com o comportamento proliferativo e invasivo deste tipo de neoplasia.

A expressão de COX-2 foi maior no leydigocitoma e reproduz os resultados obtidos nas observações em ratos e humanos, demonstrando que os mecanismos de proliferação dos sertoliomas e leydigocitomas podem ser os mesmos nas diferentes espécies.

A avaliação histológica dos subtipos de seminomas em cães, assim como ocorre para os humanos, pode ter valor indicativo de um melhor ou pior prognóstico. Nos subtipos de seminomas avaliados não foi observada diferença estatística, mas um maior número de amostras pode resultar em diferença significativa que permita a utilização destas proteínas como marcadores de prognóstico, particularmente para o seminoma difuso.

A avaliação histopatológica em associação ao histórico dos animais e a expressão das proteínas estudadas trouxe informações a respeito das neoplasias testiculares caninas, ainda pouco descritas na literatura. Essas informações podem contribuir para a caracterização das diferentes neoplasias em relação ao seu comportamento biológico.

7. REFERÊNCIAS

ADDEO, R.; CRISCI, S.; D'ANGELO, V.; VINCENZI, B.; CASALE, F.; PETTINATO, G.; DONOFRIO, V.; BOLDRINI, R.; ALAGGIO, R.; COLLINI, P.; BERTORELLE, R.; DI TULLIO, MT.; CARAGLIA, M.; TEREZIANI, M.; LO CURTO, M.; INDOLFI, P. Bax Mutation and overexpression inversely correlate with immature phenotype and prognosis of childhood germ cell tumours. **Oncol. Rep.**, v. 17, p. 1155-1161, 2007.

ANDRIOLO, A. Marcadores tumorais bioquímicos. **Gestão estratégica em medicina laboratorial**, n.4, p.1-3, 2005.

ANGULO, J.C.; FERRUELO, A.; RODRÍGUEZ-BARBERO, J.M.; NÚÑES, C.; FATA, F.R.; GONZÁLEZ, J. Detection and molecular staging of bladder cancer using real-time RT-PCR for gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-2 in peripheral blood. **Actas Urol. Españ.**, v. 35, n. 3, p. 127-136, 2008.

ARICÒ, A.; GIANTIN, M.; GELAIN, M.E.; RIONDATO, F.; COMAZI, S.; RÜTGEN, B.C.; ESSLER, S.E.; DACASTO, M.; CASTAGNARO, M.; ARESU, L. The role of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in canine lymphoma: in vivo and in vitro study. **BMC Vet. Res.**, v. 9, p. 1-10, 2013.

BANCO, B.; GIUDICE, C.; VERONESI, M.C.; GEROSA, E.; GRIECO, V. An immunohistochemical study of normal and neoplastic canine sertoli cells. **J. Comp. Pathol.**, v. 143, p. 239-247, 2010.

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

BODER, J.; ABDALLA, F.; ELFAGIEH, M.; BUHMEIDA, A.; COLLAN, Y. Proliferative activity in libyan breast cancer with comparison to European and central african patients. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, 831714, 2013.

CARRASCO, V.; CANFRÁN, S.; RODRÍGUEZ-FRANCO, F.; BENITO, A.; SÁINZ, A.; RODRÍGUEZ-BERTOS, A. Canine gastric carcinoma: Immunohistochemical expression of cell cycle proteins (p53, p21 and p16) and heat shock proteins (Hsp27 and Hsp 70). **Vet. Pathol.**, v.48, n.1, p. 322-329, 2011.

CIAPUTA, R.; NOWAK, M.; KIELBOWICZ, M.; ANTONCZYK, A.; BLAZIAK, K.; MADEJ, J.A. Seminoma, sertolioma and leydigocitoma in dogs: clinical and morphological correlations. **Bull. Vet. Inst. Pulawy.**, v. 56, p. 361-367, 2012.

COOLEY, D.M.; SCHLITTLER, D.L.; GLICKMAN, L.T.; HAYEK, M.; WATERS, D.J. Exceptional longevity in pet dogs is accompanied by cancer resistance and delayed onset of major diseases. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 58, p. 1078-1084, 2003.

D'ANGELO, A.R.; VITA, S.; MARRUCHELLA, G.; FRANCESCO, G. Canine testicular tumors: a retrospective investigation in Abruzzo and Molise, Italy. **Vet. Ital.**, v. 48, p. 335-339, 2012.

DE NARDI, A.B. **Correlação da Ciclooxygenase-2 com Ki-67, P53, e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 92 f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

DORÈ, M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. **Vet. Pathol.**, v. 48, p. 254-265, 2011.

EISENBERG, A.L.A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (Revisão de literatura). **Rev. Bras. Cancerol.**, v.47, n.4, p. 377-388, 2001.

ESTÈVE, P.O.; CHICOINE, E.; ROBLEDO, O.; AOUDJIT, F.; DESCOTEAUX, A.; POTWOROWSKI, E.F.; ST-PIERRE, Y. Protein kinase C- ζ regulates transcription of the Matrix Metalloproteinase-9 gene induced by IL-1 and TNF- α in glioma cells via NF- κ B. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35150-35155, 2002.

FAN, T.M.; LORIMIER, L.F. Tumors of the male reproductive system. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 637-641.

FIGHERA, R.A.; SOUZA, T.M.; SILVA, M.C.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 28, p. 223-230, 2008.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W. The male genital system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 5.ed. Nova York: Saunders, 2007. v. 3, p. 611-619.

FREITAS, E.P.; RAHAL, S.C.; CIANI, R.B. Distúrbios físicos e comportamentais em cães e gatos idosos. **Arch. Vet. Sci.**, v. 11, n. 3, p. 26-30, 2006.

GALLEGOS, I.; VALDEVENITO, J.P.; MIRANDA, R.; FERNANDEZ, C. Immunohistochemistry expression of P53, Ki67, CD30, and CD117 and presence of clinical metastasis at diagnosis of testicular seminoma. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 19, p. 147-152, 2011.

GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICO, A.; MORELLO, E.M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R.M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. **J. Comp. Pathol.**, v. 147, p. 419-429, 2012.

GILLIGAN, T. Testicular câncer. In: CHABNER, B.A.; LYNCH JR, T.J.; LONGO, D.L. **Harrison's manual of oncology**. Nova York: McGraw Hill, 2008. p. 365-372.

GRIECO, V.; RICCARDI, E.; RONDENA, V.; CIAMPI, V.; FINAZZI, M. Classical and spermatocytic seminoma in the dog: histochemical and immunohistochemical findings. **J. Comp. Pathol.**, v. 137, p. 41-46, 2007.

GRIECO, V.; RONDENA, M.; ROMUSSI, S.; STEFANELLO, D.; FINAZZI, M. Immunohistochemical Characterization of the Leucocytic Infiltrate Associated with Canine Seminomas. **J. Comp. Pathol.**, v. 130, p. 278–284, 2004.

GRIECO, V.; RICCARDI, E.; GREPPI, G.F.; TERUZZI, F.; IERMANÒ, V.; FINAZZI, M. Canine testicular tumors: a study on 232 dogs. **J. Comp. Pathol.**, v. 138, p. 86-89, 2008.

GUILLOU, L.; ESTREICHER, A.; CHAUBERT, P.; HURLIMANN, J.; KURT, A.M.; METTHEZ, G.; IGGO, R.; GRAY, A.C.; JICHLINSKI, P.; LEISINGER, H.J.; BENHATTAR, J. Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. **Am. J. Pathol.**, v. 149, p. 1221-1228, 1996.

HADLER-OLSEN, E.; FADNES, B.; SYLTE, I.; UHLIN-HANSEN, L.; WINBERG, J. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. **FEBS J.**, v. 278, p. 28–45, 2011.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 5-12.

HASE, T.; YOSHIMURA, R.; MATSUYAMA, M.; KAWAHITO, Y.; WADA, S.; TSUCHIDA, K.; SANO, H.; NAKATANI, T. Cyclooxygenase-1 and -2 in human testicular tumours. **Eur. J. Cancer.**, v. 39, p. 2043-2049, 2003.

HORTA, R.S.; COSTA, M.P.; LAVALLE, G.E.; ARAÚJO, R.B.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos e preditivos dos tumores caninos definidos com o auxílio da imuno-histoquímica. **Cienc. Rural.**, v. 42, p. 1033-1039, 2012.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29. p. 577-580, 1981.

JOBIM, F.C.; SCHWARTSMANN, G.; XAVIER, N. L.; UCHOA, D. M.; SACIOTO, M.; CHEMELLO, N. Expressão da MMP-9 e do VEGF no câncer

de mama: correlação com outros indicadores de prognóstico. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 30, p. 287-293, 2008.

KENNEDY, P.C.; CULLEN, J.M.; EDWARDS, J.F.; GOLDSCHMIDT, M.H.; LARSEN, S.; MUNSON, L.; NIELSEN, S. **Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals**. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology and the American Registry of Pathology and The World Health Organization Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology, 1998.

KIM, J.H.; YU, C.H.; YHEE, J.Y.; IM, K.S.; KIM, N.H.; SUR, J.H. Canine classical seminoma: a specific malignant type with human classifications is highly correlated with tumor angiogenesis. **BMC Cancer**, v.10, n. 243, p. 1-9, 2010.

LEROY, X.; AUGUSTO, D.; LETEURTRE, E.; GOSSELIN, B. CD30 and CD117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 50, p. 283–285, 2002.

LIAO, A.T.; CHU, P.; YEH, L.; LIN, C.; LIU, C. A 12-Year retrospective study of canine testicular tumors. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n.7, p. 919–923, 2009.

LIN, P.; LIN, Y.; LEE, C.; LIU, H.; LEE, J. Cyclooxygenase-2 expression in the tumor environment is associated with poor prognosis in colorectal cancer patients. **Oncol. Letters**, v. 6, p. 733-739, 2013.

MAIOLINO, P.; RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; PACIELLO, O.; DE VICO, G. Correlation of nuclear morphometric features with animal and human World Health Organization International Histological Classifications of canine spontaneous seminomas. **Vet. Pathol.**, v. 41, p. 608–611, 2004.

MANDARA, M.T.; PAVONE, S.; MANDRIOLI, L.; BETTINI, G.; FALZONE, C.; BARONI, M. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9

expression in canine and feline meningioma. **Vet. Pathol.**, v. 46, n. 5, p. 836-845, 2009.

MATSUYAMA, M.; YOSHIMURA, R. Arachidonic acid pathway: a molecular target in human testicular cancer (Review). **Mol. Med. Rep.**, v. 2, n. 4, p. 527-531, 2009.

MAZUMDAR, M.; BACIK, J.; TICKOO, S.K.; DOBRZYNSKI, D.; DONADIO, A.; BAJORIN, D.; MOTZER, R.; REUTER, V.; BOSL, G.J. Cluster analysis of p53 and Ki-67 expression, apoptosis, alpha-fetoprotein, and human chorionic gonadotrophin indicates a favorable prognostic subgroup within the embryonal carcinoma germ cell tumor. **J. Clin. Oncol.**, v. 21, p. 2679-2688, 2003.

MENEZES, H.L.; JUCÁ, M.J.; GOMES, E.G.A.; NUNES, B.L.B.B.P.; COSTA, H.O.; MATOS, D. Analysis of the immunohistochemical expressions of p53, bcl-2 and Ki-67 in colorectal adenocarcinoma and their correlations with the prognostic factors. **Arq. Gastroenterol.**, v. 47, p. 141-147, 2010.

MERLO, D.F.; ROSSI, L.; PELLEGRINO, C.; CEPPI, M.; CARDELLINO, U.; CAPURRO, C.; RATTO, A.; SAMBUCCO, P.L.; SESTITO, V.; TANARA, G.; BOCCHINI, V. Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, p. 976–984, 2008.

MEYERS-WALLEN, V.N. Application of genomic and molecular methods to fundamental questions in canine and feline reproductive health. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 47, p. 309-312, 2012.

MILIA-ARGEITI, E.; HUET, E.; LABROPOULOU, V.T.; MOURAH, S.; FENICHEL, P.; KARAMANOS, N.K.; MENASHI, S.; THEOCHARIS, A.D. Imbalance of MMP-2 and MMP-9 expression versus TIMP-1 and TIMP-2 reflects increased invasiveness of human testicular germ cell tumours. **Int. J. Androl.**, v.35, p. 835-44, 2012.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small animal oncology**. Oxford: Blackwell Science, 2001. p. 184-191.

NØDTVEDT, A.; GAMLEM, H.; GUNNES, G.; GROTMOL, T.; INDREBØ, A.; MOE, L. Breed differences in the proportional morbidity of testicular tumors and distribution of histopathologic types in a population-based canine cancer registry. **Vet. Comp. Oncol.**, v.9, n.1, p. 45-54, 2011.

PAPANOIANNOU, N.; PSALLA, D.; ZAVLARIS, M.; LOUKOPOULOS, P.; TZIRIS, N.; VLEMMAS, I. Immunohistochemical expression of dogTERT in canine testicular tumours in relation to PCNA, Ki67 and p53 expression. **Vet. Res.**, v. 33, p. 905-919, 2009.

PECTASIDES, D.; PAPAXOINIS, G.; NIKOLAOU, M.; VALAVANIS, C.; ARAVANTINOS, G.; FOUNTZILAS, G.; TAMVAKIS, N.; PECTASIDES, E.; LEKKA, I.; ARAPANTONI-DADIOTI, P.; ZIZI, A.; GHICONTI, I.; ECONOMOPOULOS, T. Analysis of 7 Immunohistochemical markers in male germ cell tumors demonstrates the prognostic significance of p53 and MIB-1. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 2, p. 737-744, 2009.

PEREIRA, R.S.; SCHWEIGERT, A.; MELO, G.D.; FERNANDES, F.V.; SUEIRO, F.A.R.; MACHADO, G.F. Ki-67 labeling in canine perianal glands neoplasms: a novel approach for immunohistological diagnostic and prognostic. **BMC Vet. Res.**, v. 9, 2013.

PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GÄRTNER, F. Canine tumours: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Res.**, v. 159, p. 165-171, 2012.

PIRES, I.; GARCIA, A.; PRADA, J.; QUEIROGA, F.L. COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. **J. Comp. Pathol.**, v. 143, p. 142-149, 2010.

PRADA, J.; QUEIROGA, F.L.; GREGORIO, H.; PIRES, I. Evaluation of Cyclooxygenase-2 expression in canine mast cell tumours. **J. Comp. Pathol.**, v. 147, p. 31-36, 2012.

REIF, J.S. The epidemiology and incidence of cancer. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 4. ed. Philadelphia: WB Saunders, 2007. p. 637-641.

SAMUELSON, D.A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 527p.

SANTOS, A.A.; LOPES, C.C.; RIBEIRO, J.R.; MARTINS, L.R.; SANTOS, J.C.; AMORIM, I.F.; GÄRTNER, F.; MATOS, A.J. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Vet. Res.**, v. 9, p. 1-11, 2013.

SCHMITT, F.C. Marcadores prognósticos em carcinoma mamário. In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALLO, J. **Manual de Imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. p. 30-46.

SIRIANNI, R.; CHIMENTO, A.; DE LUCA, A.; ZOLEA, F.; CARPINO, A.; RAGO, V.; MAGGIOLINI, M.; ANDÒ, S.; PEZZI, V. Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates aromatase activity and decreases proliferation of Leydig tumor cells. **J. Biol. Chem.**, v. 284, 28905–28916, 2009.

SIU, M.K.Y., LEE, W.M., CHENG, C.Y. The Interplay of Collagen IV, Tumor Necrosis Factor- α , Gelatinase B (Matrix Metalloprotease-9), and Tissue Inhibitor of Metalloproteases-1 in the Basal Lamina Regulates Sertoli Cell-Tight Junction Dynamics in the Rat Testis. **Endocrinology**, v. 144, n. 1, p. 371-387, 2003.

TRAPP, S.M.; IACUZIO, A.I.; BARCA JUNIOR, F.A.; KEMPER, B.; SILVA, L.C.; OKANO, W.; TANAKA, N.M.; GRECCO, F.C.A.R.; CUNHA FILHO, L.F.C.; STERZA, F.A.M. Causas de óbito e razões para eutanásia em uma população

hospitalar de cães e gatos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 47, p. 395-402, 2010.

VASCELLARI, M.; BAIONI, E.; RU, G.; CARMINATO, A.; MUTINELLI, F. Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. **BMC Vet. Res.**, v. 5, p. 1-9, 2009.

VITELLOZZI, G.; MARIOTTI, F.; RICCI, G. Immunohistochemical expression of the p53 protein in testicular tumours in the dog. **Eur. J. Vet. Pathol.**, v. 4, p. 61–65, 1998.

YU, C.; HWANG, D.; YHEE, J.; KIM, J.; IM, K.; NHO, W.; LYOO, Y.; SUR, J. Comparative immunohistochemical characterization of canine seminomas and Sertoli cell tumors. **J. Vet. Sci.**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2009.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUIZ, C.M.; ANDRADE, J.C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: Correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 28, p. 207-215, 2008.