

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR  
 $\beta$  E INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2  
EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES  
PROLIFERATIVAS**

Denise Caroline Toledo

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura

GOIÂNIA

2012

DENISE CAROLINE TOLEDO

**EXPRESSÃO DE FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR  $\beta$  E  
INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2 EM  
PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Área de Concentração:**

Patologia, Clínica e Cirurgia Animal

**Linha de Pesquisa:**

Patobiologia animal, experimental e comparada

**Orientadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura - EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliana Borges de Menezes (IPTSP/UFG)

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito (EVZ/UFG)

GOIÂNIA

2012

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, **Maria de Fátima e Henrique de Sousa**, que com muito amor me mostraram que com educação e honestidade se chega longe.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Pelos cuidados e dedicação que tiveram comigo, principalmente diante dos últimos fatos ocorridos em minha vida, sem vocês, **Maria de Fátima Santos Toledo e Henrique de Sousa Toledo**, eu não seria ninguém!

A **Deus**, por TUDO!

Ao meu namorado, **Douglas Duarte**, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo. Ainda, por nesses últimos anos, ter me transmitido tranquilidade para percorrer os caminhos, nem sempre fáceis, que a vida me reservou.

Às minhas irmãs, **Ludmilla Maria Toledo, Juliana Cristina Toledo e Nathália Daniele Toledo**, simplesmente pelo fato de existirem na minha vida e sempre estarem presentes.

À minha sobrinha, **Maria Eduarda Toledo Sakamoto**, quem mais se orgulha da profissão que escolhi. Obrigada por estar comigo sempre, fazendo tudo valer a pena.

À minha orientadora, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura**, que me orientou com carinho. Muito obrigada pelos conhecimentos repassados com entusiasmo e dedicação.

Aos amigos, **Adriana Marques Faria, Adriana da Silva Santos, Hugo Henrique Ferreira, Mariana Batista Rodrigues Faleiro, Natália Menezes** e, especialmente, a **Julia M. Moraes**. Muito obrigada pelas visitas, passeios, risadas e por todos os favores que me fizeram. E a você, **Júlia**, um agradecimento especial pela ajuda que me prestou nesse último mês, sem esse apoio essa vitória não seria possível.

Aos companheiros de Setor, **Aline Maria Vasconcelos Lima, Danilo Rezende, Fernanda Figueiredo, Flávia Lima, Yandra Lobato, Lorena Lima, Rakel Cândido e Vanessa Souza**, obrigada!

Aos professores doutores do Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG, **Ana Paula Iglessias Santin, Eugênio Gonçalves de Araújo, Moema Pacheco Chediak Matos e Regiani Nascimento Gagno Porto**. E ao técnico **Antônio Souza da Silva**.

Aos co-orientadores, **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliana Borges de Menezes** e **Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito**.

A todas as pessoas que trabalham para possibilitar a existência do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

**Muito Obrigada!**

"A cada dia Deus nos concede uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta."

Chico Xavier

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>                                                                                                                               | <b>1</b>      |
| <b>1.1.Aspectos morfofisiológicos da próstata .....</b>                                                                                                                        | <b>1</b>      |
| <b>1.2.Afecções prostáticas .....</b>                                                                                                                                          | <b>3</b>      |
| 1.2.1.Hiperplasia prostática benigna .....                                                                                                                                     | 4             |
| 1.2.2.Atrofia inflamatória proliferativa da próstata .....                                                                                                                     | 5             |
| 1.2.3.Neoplasia intraepitelial prostática.....                                                                                                                                 | 7             |
| 1.2.4.Neoplasias prostáticas .....                                                                                                                                             | 9             |
| <b>1.3.Metaloproteinases de matriz (MMP), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e remodelação da matriz extracelular nas lesões prostáticas proliferativas.....</b> | <b>11</b>     |
| <b>1.4. Fator de Crescimento Transformador beta - TGF-<math>\beta</math> .....</b>                                                                                             | <b>17</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                        | <b>19</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2 EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS.....</b>                             | <br><b>29</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                                                                             | <b>29</b>     |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                                                                           | <b>30</b>     |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                        | <b>31</b>     |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                | <b>32</b>     |
| Material e avaliação histomorfológica.....                                                                                                                                     | 32            |
| Microarranjo tecidual ( <i>Tissue Microarray</i> – TMA) .....                                                                                                                  | 33            |
| Imunoistoquímica.....                                                                                                                                                          | 33            |
| Análise estatística.....                                                                                                                                                       | 34            |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                         | <b>35</b>     |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                         | <b>41</b>     |
| <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                        | <b>45</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                        | <b>45</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE TGF-<math>\beta</math> EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS .....</b>                                                     | <br><b>50</b> |

|                                                               |               |
|---------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>RESUMO.....</b>                                            | <b>50</b>     |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                          | <b>51</b>     |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                       | <b>52</b>     |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                               | <b>53</b>     |
| Material e avaliação histomorfológica.....                    | 53            |
| Microarranjo tecidual ( <i>Tissue Microarray</i> – TMA) ..... | 54            |
| Imunoistoquímica.....                                         | 54            |
| Análise estatística .....                                     | 55            |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                        | <b>56</b>     |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                                        | <b>60</b>     |
| <b>CONCLUSÕES .....</b>                                       | <b>62</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                       | <b>62</b>     |
| <br><b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>             | <br><b>65</b> |



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

- FIGURA 1 – Localização anatômica da próstata canina. Vista ventrodorsal da cavidade pélvica canina. A próstata (2), caudal a bexiga (1), cranial a uretra pélvica (4) e ventral ao reto (3), no interior da cavidade pélvica. Fonte: Di Santis (2007).....1
- FIGURA 2 - Fotomicrografia da próstata canina. Histomorfologia normal. Epitélio secretor com células cúbicas a colunares dispostas em camada única (seta). HE, objetiva 40x. Fonte: Toledo et al. (2010).....3
- FIGURA 3 - Fotomicrografias de hiperplasia prostática benigna canina. A) Hiperplasia estromal. B) Hiperplasia epitelial cística. C) Hiperplasia epitelial papilífera. HE. Fonte: Fonseca Alves et al. (2010).....5
- FIGURA 4 - Fotomicrografias da próstata canina. A) Atrofia inflamatória proliferativa. Atrofia acinar, dupla camada de células epiteliais (seta) e agregados de células mononucleares intersticiais (asterístico). B) Atrofia inflamatória proliferativa. Infiltrado inflamatório intersticial e atipias epiteliais. Mais de uma camada de células epiteliais (seta), citoplasma marcadamente reduzido, núcleos aumentados e nucléolos evidentes. HE. Fonte: Toledo et al. (2010).....7
- FIGURA 5 - Fotomicrografia da próstata canina. Focos de neoplasia intraepitelial prostática. Notar estratificação, núcleos aumentados e com nucléolos evidentes, e áreas de perda de diferenciação epitelial (seta cheia). Ainda, aumento da densidade capilar na periferia da lesão (setas vazadas). HE. Fonte: Di Santis (2007).....8
- FIGURA 6 - Fotomicrografia da próstata canina. Carcinoma. Proliferação celular com atipias e perda da conformação acinar. HE, 40x. Fonte: Faleiro (2010).....9

## **CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2 EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

FIGURA 1 - Fotomicrografias de próstata canina. IHQ, anti-TIMP-1, objetiva 20x.

A) Próstata normal. Células epiteliais (seta vazada) a estromais (seta cheia) com escores de marcação um e dois, respectivamente. B) HPB estromal. Escores zero e dois para células epiteliais e estromais (seta cheia), respectivamente. C) HPB epitelial. Células do estroma periacinar marcadas em escore três (seta cheia) e ausência de marcação nas células epiteliais (seta vazada). D) Carcinoma prostático. Marcação em escore três nas células estromais (seta cheia) e ausência de marcação de células epiteliais neoplásicas.....37

FIGURA 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de intensidade de marcação imunoistoquímica das células estromais periacinares por anti-TIMP-1 nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.....38

FIGURA 3 - Fotomicrografias de próstata canina. IHQ, anti-TIMP-2, objetiva 20x.

A) Próstata normal. Células epiteliais com escore três para intensidade de marcação (seta) e células estromais não marcadas. B) Carcinoma prostático. Células epiteliais neoplásicas com escore um (seta) e estromais com escore zero para a intensidade de marcação.....40

FIGURA 4 – Distribuição dos casos de acordo com os escores encontrados para a intensidade de marcação das células epiteliais acinares pelo TIMP-2 nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.....40

## **CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE TGF- $\beta$ EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

FIGURA 1 - Fotomicrografias de próstata canina. IHQ, anti-TGF-  $\beta$ , objetiva 20x.

A) Próstata normal. Células epiteliais (seta vazada) e estromais (seta cheia) com escore dois para intensidade de marcação. B) Carcinoma prostático. Células epiteliais com escore um (seta) e estromais com escore zero para a intensidade de marcação.....58

FIGURA 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores para a intensidade de marcação das células epiteliais acinares pelo TGF- $\beta$  nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.....59

FIGURA 3 – Distribuição dos casos de acordo com os escores encontrados para a intensidade de marcação imunoistoquímica das células estromais periacinares pelo TGF- $\beta$  nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.....60

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1 - Principais metaloproteinases de matriz e seus substratos. Fonte:<br>Adaptado de RODASKI & PIEKARZ (2009)..... | 14 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### **CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2 EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| QUADRO 1 – Escores utilizados para classificação da intensidade de marcação de células epiteliais e estromais da próstata canina.....                                                                    | 35 |
| TABELA 1 – Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação pelo anticorpo TIMP-1 nas células epiteliais acinares e estromais em relação ao diagnóstico..... | 36 |
| TABELA 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação pelo anticorpo TIMP-2 nas células epiteliais acinares e estromais em relação ao diagnóstico..... | 39 |
| TABELA 3 – Correlação entre TIMP-1 e TIMP-2 em próstatas normais e com lesões proliferativas de acordo com a intensidade de marcação do epitélio e do estroma glandular.....                             | 41 |

### **CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE TGF- $\beta$ EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

QUADRO 1 - Escores utilizados para classificação da intensidade de marcação de células epiteliais e estromais da próstata canina.....56

TABELA 1 - Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação do anticorpo TGF- $\beta$  nas células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico.....57

## LISTA DE ABREVIATURAS

DAB – diaminobenzidina

HE – hematoxilina e eosina

HGPIN – neoplasia intra-epitelial prostática de alto grau

HPB – hiperplasia prostática benigna

IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina

LGPIN – neoplasia intra-epitelial prostática de baixo grau

MB – membrana basal

MEC – matriz extracelular

MMP- metaloproteinase de matriz

MT-MMP- metaloproteinase de matriz do tipo ligada à membrana

PCa – porção caudal da próstata

PCr – porção cranial da próstata

PIA – atrofia inflamatória proliferativa

PIN – neoplasia intra-epitelial prostática

PM – porção média da próstata

SDS - dodecil sulfato de sódio

TGF- $\beta$  – fator de crescimento transformador beta

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz

TIMP-1 – inibidor tecidual de metaloproteinase 1

TIMP-2 – inibidor tecidual de metaloproteinase 2

TMA – microarranjo tecidual (tissue microarray)

## RESUMO

A próstata canina, além das similaridades com a próstata humana, apresenta grande incidência de afecções. As principais lesões que acometem a próstata são as prostatites, a hiperplasia prostática benigna (HPB), os cistos e o adenocarcinoma, sendo que, recentemente, se tem dado atenção às lesões consideradas pré-malignas, como a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA), ambas estudadas na glândula humana, e também verificadas na próstata do cão. Para avaliar o desenvolvimento de neoplasias prostáticas a partir das lesões pré-malignas, alguns marcadores imunoistoquímicos são empregados, como os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), que apresentam importante função na regulação da ação catalítica das metaloproteinases (MMP), e o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que induz a angiogênese e inibe a proliferação celular, sendo considerado um mediador do crescimento prostático. O objetivo deste estudo foi verificar a expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TGF- $\beta$  no tecido prostático canino normal e com lesões proliferativas. Para isso foram colhidas, em exames necroscópicos, 150 próstatas de cães adultos e idosos. O material foi avaliado histologicamente e selecionadas amostras de 54 próstatas com predominância de histomorfologia normal, HPB epitelial, HPB estromal, PIA, PIN e adenocarcinoma, que foram utilizadas para a confecção de um bloco de microarranjo tecidual (*Tissue Microarray* - TMA). As lâminas de TMA foram submetidas à imunoistoquímica com os anticorpos anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 e anti-TGF- $\beta$ , sendo avaliada a intensidade de marcação das células epiteliais e estromais. Verificou-se que há marcação citoplasmática das células prostáticas caninas para TIMP-1, TIMP-2 e TGF- $\beta$ , sendo as proteínas TIMP-1 e TIMP-2 mais expressas nas lesões proliferativas pré-malignas e malignas, enquanto TGF- $\beta$  foi expresso principalmente pelo tecido normal e com HPB epitelial e estromal. Ainda, houve diferença de marcação entre células epiteliais e estromais.

**Palavras-chave:** cão, displasia prostática, imunoistoquímica, TGF-  $\beta$ , TIMP-1, TIMP-2.

## ABSTRACT

The canine gland has drawn interest for research due to its similarities with the human prostate and the great incidence of lesions. Moreover, the canine prostate shows high incidence of diseases. The main lesions that affect the prostate are prostatitis, benign prostatic hyperplasia (BPH), cysts and adenocarcinoma. Recently attention has been given to lesions considered premalignant such as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and proliferative inflammatory atrophy (PIA), both studied in the human gland and also found in the canine prostate. In order to evaluate the development of prostate cancer starting as premalignant lesions, some immunohistochemical markers are employed, such as tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP), which have a key role in regulating the catalytic action of metalloproteinases (MMP), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), that induces angiogenesis and inhibits cell proliferation and is considered a mediator of prostate growth. The objective of this study was to investigate the expression of TIMP-1, TIMP-2 and TGF- $\beta$  in canine normal prostate tissue and with proliferative lesions. For this, 150 adult canine prostates were obtained from postmortem examinations. After microscopic evaluation 54 glands, compatible with normal, epithelial BPH, stromal BPH, PIA, PIN and adenocarcinoma were selected and used to make tissue microarray block (Tissue Microarray - TMA). TMA slides were subjected to immunohistochemistry with anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 and anti-TGF- $\beta$ , to assess staining intensity of epithelial cells and stromal cells. Cytoplasmatic staining of canine prostate cells by TIMP-1, TIMP-2 and TGF- $\beta$  was observed, with TIMP-1 and TIMP-2 being more expressed in premalignant and malignant lesions, while TGF- $\beta$  was expressed mainly by normal tissue and BPH. Furthermore, there were differences in the expression between epithelial and stromal cells.

**Keywords:** dog, immunohistochemistry, prostatic dysplasia, TGF- $\beta$ , TIMP-1, TIMP-2.



## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1.1. Aspectos morfofisiológicos da próstata

Na espécie canina, a próstata é a única glândula sexual acessória (MURASHIMA JÚNIOR, 2001). Consiste em órgão músculo-glandular bilobulado, de formato esférico a oval, dividido por um septo mediano fibroso (JOHNSTON et al., 2001). O órgão apresenta cápsula constituída por tecido fibromuscular e é margeado por tecido adiposo (MURASHIMA JÚNIOR, 2001).

A próstata localiza-se predominantemente no espaço retroperitoneal, caudal à bexiga, dorsal à sínfise púbica e ventral ao reto, envolvendo a uretra em sua porção inicial, entre a uretra membranosa e o colo vesical (JOHNSTON et al., 2001). Em relação ao posicionamento, a próstata aloca-se no abdômen caudal ou na cavidade pélvica, a depender da idade, distensão da bexiga e de enfermidades que acometem a glândula (Figura 1) (KUTZLER & YEAGER, 2005).

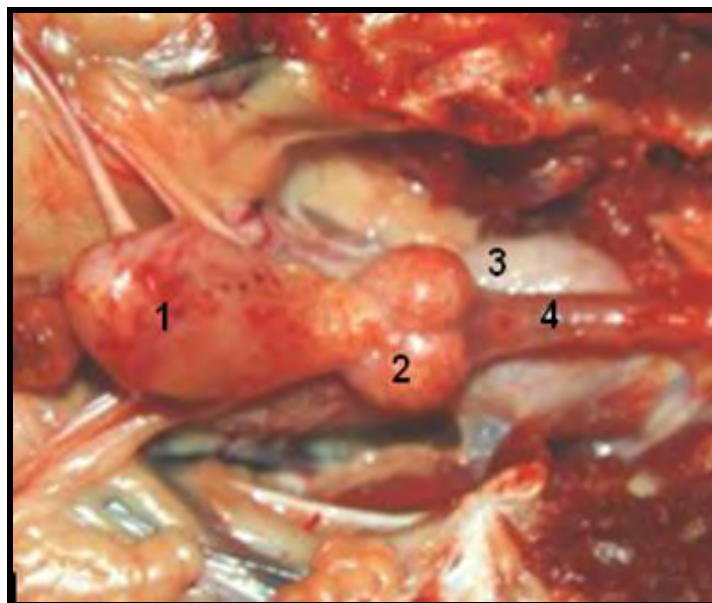


FIGURA 1 – Localização anatômica da próstata canina. Vista ventrodorsal da cavidade pélvica canina. A próstata (2), caudal a bexiga (1), cranial a uretra pélvica (4) e ventral ao reto (3), no interior da cavidade pélvica. Fonte: Di Santis (2007).

A artéria prostática, que se origina da artéria pudenda interna, e as veias prostática e uretral configuram os principais vasos sanguíneos responsáveis pela irrigação da próstata (JOHNSTON et al., 2001). Os vasos e os nervos responsáveis, respectivamente, pelo suprimento sanguíneo e pela inervação da próstata penetram na superfície dorsolateral do órgão, e se relacionam também ao suprimento para o colo vesical, uretra e reto (VANNUCCHI et al., 1997).

A função da próstata é a produção do líquido prostático, que nutre, protege e facilita o transporte dos espermatozoides durante a ejaculação (DE MARZO et al., 1999). A produção e a liberação desse fluido ocorrem por estimulação hormonal e nervosa, sendo que a produção aumenta por estímulo parassimpático e a secreção é desencadeada por estímulo simpático (VANNUCCHI et al., 1997). O líquido prostático é produzido por células epiteliais glandulares e dependente de hormônios andrógenos como a diidrotestosterona (JOHNSTON et al., 2000).

No cão, a próstata é dividida em lóbulos sustentados por estroma e envoltos por espessa cápsula fibromuscular. Cada lóbulo é constituído por ácinos túbulo-alveolares envoltos pelo estroma (Figura 2), e os ductos prostáticos abrem-se no interior da uretra proximal, ao redor dos orifícios dos ductos deferentes, formando o colículo seminal (JOHNSTON et al., 2001).

O epitélio acinar tem formato cúbico a cilíndrico, sendo composto por dois tipos celulares principais, as células do epitélio secretor colunar alto e as do epitélio basal, que se localiza ao longo da membrana basal. Nos ductos excretores o epitélio é do tipo transicional (MAHAPOKAI et al., 2000).

O estroma prostático é constituído por fibroblastos e células musculares lisas envoltos por colágeno, além dos constituintes vasculares e nervosos. Desempenha função primordial na modulação da proliferação e da diferenciação epitelial, sendo responsável pela produção de fatores de crescimento que agem tanto no desenvolvimento prostático normal como nas enfermidades (CASTELLUCCI et al., 1996).

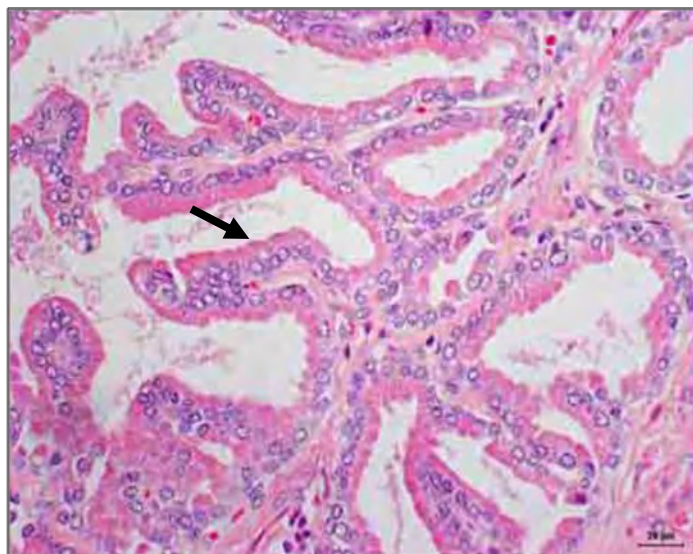


FIGURA 2 - Fotomicrografia da próstata canina. Histomorfologia normal. Epitélio secretor com células cúbicas a colunares dispostas em camada única (seta). HE, objetiva 40x. Fonte: Toledo et al. (2010).

## 1.2. Afecções prostáticas

Doenças prostáticas são frequentemente encontradas em humanos e também na espécie canina, acometendo comumente cães não castrados adultos e idosos. Dentre as afecções prostáticas proliferativas diagnosticadas no cão destacam-se a hiperplasia prostática benigna (HPB) (FONSECA ALVES et al., 2010) e o adenocarcinoma (TOMAS et al., 2007). Ainda, pode-se destacar as lesões displásicas consideradas pré-malignas, como a atrofia inflamatória proliferativa (PIA) (DI SANTIS, 2007; TOLEDO et al., 2010) e a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (DI SANTIS, 2007; RODRIGUES et al., 2010).

Os sinais clínicos das diferentes afecções da próstata são semelhantes. Apesar disso, as enfermidades prostáticas geralmente cursam sem sinais evidentes ao proprietário do animal ou ao clínico veterinário, o que dificulta a detecção dessas doenças, resultando em prognóstico desfavorável no caso do adenocarcinoma prostático (CORNELL et al., 2000).

Dentre os sinais clínicos considerados comuns nas prostatopatias caninas estão o tenesmo, o gotejamento de sangue independente da micção, a hematúria e as infecções recorrentes do trato urinário. No cão, o tenesmo é o sinal mais frequente e ocorre devido ao aumento excêntrico da próstata, que comprime o reto e dificulta a defecação. Sinais inespecíficos como febre, indisposição e dor abdominal caudal são observados em animais com infecções bacterianas e neoplasias da próstata (JOHNSTON et al., 2000).

Devido a fatores como a ocorrência natural das prostatopatias no cão e demais similaridades encontradas entre a glândula canina e a humana, estudos no cão vem sendo realizados com o objetivo de elucidar questões acerca do comportamento das doenças prostáticas nas glândulas de ambas as espécies (LEAV et al., 2001).

#### 1.2.1. Hiperplasia prostática benigna

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a principal afecção prostática em cães adultos não castrados (FONSECA ALVES et al., 2010). Esta afecção relaciona-se, tanto no homem como no cão, com o avançar da idade e alterações hormonais, principalmente ligadas à testosterona, diidrotestosterona e estrogênio (MURAKOSHI et al., 1998). Compreende proliferação benigna e hormonalmente induzida que pode ser epitelial, estromal ou mista, quando envolve estes dois componentes, podendo o órgão hiperplásico variar de pequeno e fibromuscular a volumoso e cístico (TESKE et al., 2002; FONSECA ALVES et al., 2010). Ressalta-se que na hiperplasia benigna da próstata ocorre primariamente e primordialmente aumento no número de células (hiperplasia), mas o aumento no tamanho destas (hipertrofia) também ocorre (SMITH, 2008).

De acordo com JOHNSTON et al. (2000), mais de 80% dos cães não castrados e com idade acima de cinco anos apresentam alguma evidência, mesmo que apenas histomorfológica, de HPB. O volume prostático nos animais acometidos pela hiperplasia pode ser de duas a 6,5 vezes maior que em cães que não apresentem a alteração e tenham o mesmo porte e peso.

A HPB caracteriza-se por proliferação do epitélio acinar, podendo ocorrer projeções para o interior do lúmen, sendo esta forma denominada hiperplasia epitelial papilífera. Quando caracterizada por grandes ácidos glandulares dilatados, irregulares e revestidos por epitélio cúbico achatado, com ou sem secreção luminal, a HPB é denominada epitelial cística. Outro tipo de hiperplasia também observada é a estromal, em que predomina a proliferação do estroma fibroso ou muscular ou ambos, associado ou não a atrofia glandular (TESKE et al., 2002). Ainda, FONSECA ALVES et al. (2010) relatam que é frequente a concomitância de mais de um tipo hiperplásico na mesma glândula (Figura 3).

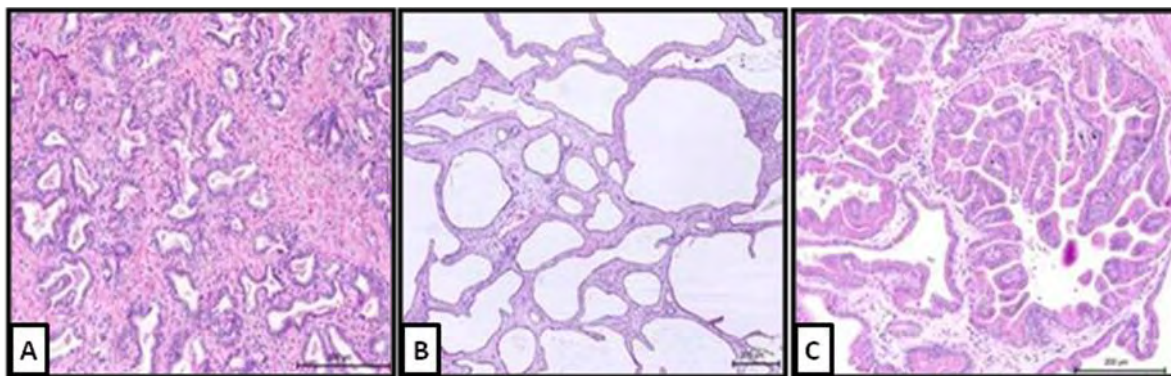


FIGURA 3 - Fotomicrografias de hiperplasia prostática benigna canina. A) Hiperplasia estromal. B) Hiperplasia epitelial cística. C) Hiperplasia epitelial papilífera. HE.

Fonte: Fonseca Alves et al. (2010).

#### 1.2.2. Atrofia inflamatória proliferativa da próstata

A atrofia inflamatória proliferativa prostática, do inglês *proliferative inflammatory atrophy* (PIA), é considerada lesão pré-maligna devido a similaridades morfológicas com o carcinoma prostático e por envolver fatores potencialmente carcinogênicos como a inflamação (DE MARZO et al., 2006). Consiste em lesão displásica e proliferativa do epitélio prostático, concomitante a

diversos graus de inflamação intersticial adjacente, sendo frequente na próstata humana (DE MARZO et al., 1999) e também descrita na glândula canina (TOLEDO et al., 2010).

A estreita relação anatômica entre a próstata, a uretra proximal e a bexiga reflete a elevada frequência das afecções prostáticas devido à infecção ascendente, o que leva à ocorrência de inflamação (APPARÍCIO et al., 2006). Outra via de contaminação é a hematógena (BARSANTI & FINCO, 1997) e, muito menos comuns, mas possíveis, são as difusões renais, testiculares, epididimárias e peritoneais (RODRIGUES et al., 2010).

A inflamação é sugerida como um fator etiológico capaz de incitar a carcinogênese por causar dano ao genoma celular, promover a substituição celular e criar um microambiente tecidual rico em citocinas e fatores de crescimento que podem elevar a replicação celular, a angiogênese e o reparo tecidual (PALAPATTU et al., 2004). Portanto, no que refere à carcinogênese, a inflamação pode representar um agente iniciador, com efeitos genotóxicos, ou promotor, pelos efeitos citotóxicos (PLATZ & DE MARZO, 2004).

O termo atrofia inflamatória proliferativa (PIA) foi proposto por DE MARZO et al. (1999) para designar focos de epitélio glandular proliferativo com o aspecto morfológico de atrofia simples ou hiperplasia pós-atrótica (PAH), ocorrendo em associação à inflamação. Os mesmos autores explicam que, apesar da proliferação, a lesão não cresce em volume devido a uma possível perda celular que compensa a proliferação. Além disso, crêem que o epitélio em regeneração suprime a apoptose, ao menos temporariamente, para substituir as células perdidas, o que embasa o conceito de que a PIA é uma lesão regenerativa.

PUTZI & DE MARZO (2000) acreditam que a PIA possa representar um precursor da neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e/ou do carcinoma prostático. Segundo DE MARZO et al. (2003), todas as formas de atrofia focal da próstata são proliferativas e a ampla maioria está associada à inflamação, de maneira que essas lesões podem originar-se em um cenário de estresse oxidativo aumentado, possivelmente derivado das células inflamatórias próximas.

TOLEDO et al. (2010) constataram grande número de próstatas caninas apresentando focos de inflamação aguda ou crônica, classificadas em



discreta, moderada ou acentuada. O infiltrado inflamatório relacionava-se topograficamente com focos de atrofia glandular acompanhados de atipias epiteliais, o que caracteriza histomorfologicamente a PIA na próstata desta espécie (Figura 4).

A PIA na espécie canina, assim como relatado por DE MARZO et al. (2006) na próstata humana, caracteriza-se morfologicamente por proliferação de células epiteliais glandulares com atipias, como núcleos volumosos, nucléolos evidentes em maior número e citoplasma escasso, associadas a infiltrado inflamatório mononuclear intersticial (TOLEDO et al., 2010).

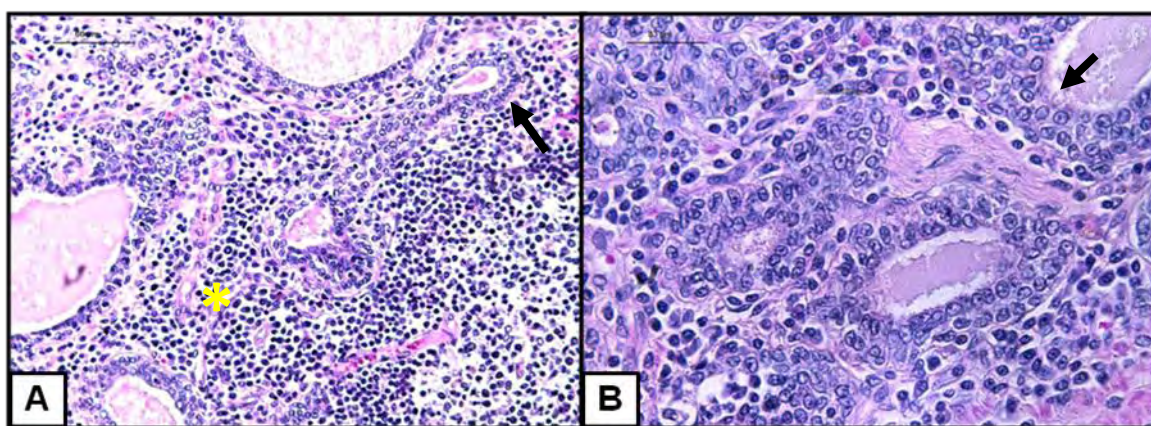


FIGURA 4 - Fotomicrografias da próstata canina. A) Atrofia inflamatória proliferativa. Atrofia acinar, dupla camada de células epiteliais (seta) e agregados de células mononucleares intersticiais (asterístico). B) Atrofia inflamatória proliferativa. Infiltrado inflamatório intersticial e atipias epiteliais. Mais de uma camada de células epiteliais (seta), citoplasma marcadamente reduzido, núcleos aumentados e nucléolos evidentes. HE.

Fonte: Toledo et al. (2010).

### 1.2.3. Neoplasia intraepitelial prostática

A neoplasia intraepitelial prostática, do inglês *prostatic intraepithelial neoplasia*, também chamada de displasia intraductal, é uma lesão considerada precursora do carcinoma invasivo, sendo caracterizada por proliferação e anaplasia celular de ductos e ácinos (RODRIGUES et al., 2010). Pode ser

classificada em baixo (*low grade prostatic intraepithelial neoplasia* - LGPIN) ou alto grau (*high grade prostatic intraepithelial neoplasia* - HGPIN), sendo esta última considerada pré-maligna (BILLIS & MAGNA, 2003).

A LGPIN caracteriza-se por hiperplasia epitelial ductal ou acinar, com marcada anisocariose, núcleos alongados e hipercromáticos, com pequenos nucléolos às vezes evidentes. A HGPIN diferencia-se de LGPIN por apresentar maior celularidade e estratificação celular, descontinuidade da camada de células basais, membrana basal íntegra, menor variação do volume nuclear, já que a maioria está aumentada, e presença de nucléolo evidente e frequentemente múltiplo (Figura 5) (BOSTWICK, 1997).

Os mecanismos de proliferação e diferenciação celular encontram-se alterados na PIN. Observam-se células basais atípicas, com potencial proliferativo, que podem migrar para o compartimento secretor, enquanto no tecido normal ou hiperplásico a capacidade proliferativa é restrita à camada basal (RODRIGUES et al., 2010).

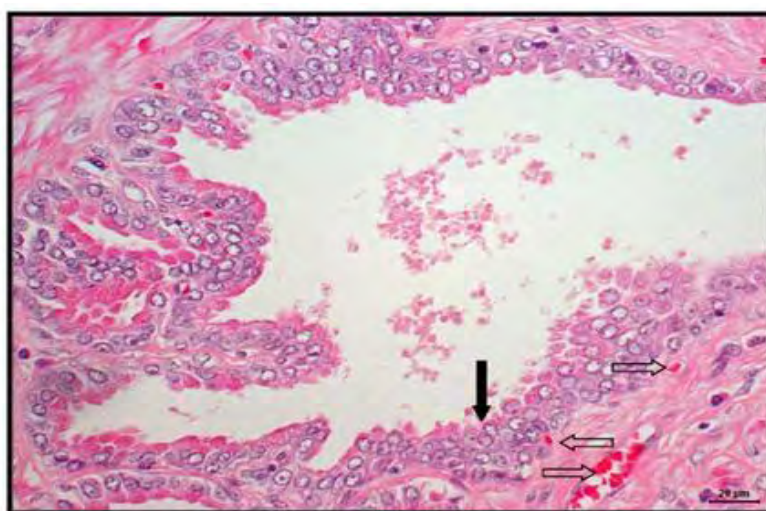


FIGURA 5 - Fotomicrografia da próstata canina. Focos de neoplasia intraepitelial prostática. Notar estratificação, núcleos aumentados e com nucléolos evidentes, e áreas de perda de diferenciação epitelial (seta cheia). Ainda, aumento da densidade capilar na periferia da lesão (setas vazadas). HE.

Fonte: Di Santis (2007).



#### 1.2.4. Neoplasias prostáticas

Além da espécie humana, a espécie canina é única dentre as já estudadas, capaz de desenvolver neoplasias prostáticas de forma espontânea (CORNELL et al., 2000; MACLACHAN & KENNEDY, 2002).

A maioria das neoplasias prostáticas caninas é epitelial maligna e apresenta estrutura glandular ou acinar, o que dá suporte a classificá-las como adenocarcinomas. No entanto, há relatos de acometimento primário da próstata por leiomiossarcomas, hemangiossarcomas e linfomas (WINTER et al., 2006).

O carcinoma prostático é mais comum em cães idosos, principalmente naqueles com mais de dez anos de idade. É clinicamente agressivo e frequentemente ocorrem metástases para linfonodos regionais, pulmões e ossos (BELL et al., 1991, TESKE et al., 2002, LEROY & NORTHRUP, 2009). Na maioria dos carcinomas humanos e caninos o padrão histológico encontrado é o intra-alveolar, sendo a morfologia heterogênea, variando de pequenos focos de células bem diferenciadas a camadas de células anaplásicas (Figura 6) (LEROY & NORTHRUP, 2009).

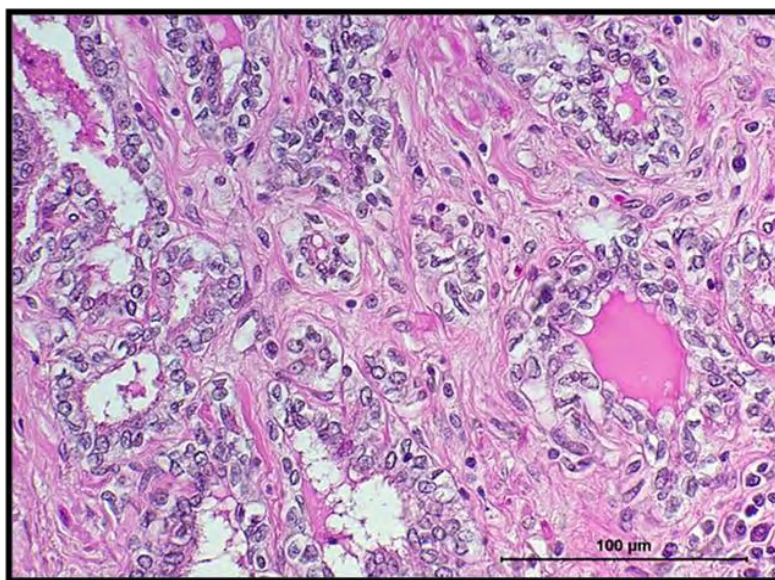


FIGURA 6 - Fotomicrografia da próstata canina. Carcinoma. Proliferação celular com atipias e perda da conformação acinar. HE, 40x.

Fonte: Faleiro (2010)

Tenesmo e disúria são os sinais clínicos frequentemente associados ao aumento de volume prostático, podendo ocorrer ainda hematuria, anorexia e perda de peso (CORNELL et al., 2000). Em associação aos focos de neoplasia da próstata canina é possível encontrar focos de HBP, dilatação glandular e inflamação supurativa ou linfoplasmocitária significativa (BARSANTI, 1995).

Na espécie humana, um sistema de graduação e classificação das neoplasias prostáticas, conhecido como escore de Gleason, é empregado com base na diferenciação glandular e no padrão de crescimento em relação ao estroma, considerando-se as atipias nucleares, e compreende um importante indicador da progressão e da evolução clínica da doença (HUMPHREY, 2004). Padrões semelhantes ao escore de Gleason foram encontrados nas neoplasias prostáticas dos cães, contudo não se conhece o significado prognóstico dessa classificação para a espécie canina, limitando a utilização da mesma na rotina diagnóstica da glândula do cão (MACLACHAN & KENNEDY, 2002).

A avaliação histológica da próstata humana sugere que o processo neoplásico tem início em lesões pré-malignas, como as displasias, em que as células sofrem alterações substanciais, diferindo-se das normais e adquirindo características proliferativas e de dominância sobre as demais ao seu redor (O'SHAUGHNESSY et al., 2002). Portanto, acredita-se que a fase inicial do adenocarcinoma da próstata corresponda à HGPIIN (BOSTWICK & QIAN, 2004; DE MARZO et al., 2006).

No cão, a ocorrência de HGPIIN com carcinoma concomitante é relatada entre 30% e 72% dos casos (AQUILINA et al., 1998; MADEWELL et al., 2004). Em contraste, na ausência de carcinoma a PIN não foi encontrada por AQUILINA et al. (1998) e foi observada em apenas 3% dos casos por MADEWELL et al. (2004).

Na espécie canina, a neoplasia prostática é altamente agressiva e não há testes de identificação rápida. Assim, metástases são observadas em cerca de 80% dos cães e localizadas preferencialmente nos linfonodos pélvicos, ilíacos internos e externos, até corpos vertebrais, sistema esquelético e pulmão (CORNELL et al., 2000; TESKE et al., 2002; LEROY & NORTHRUP, 2009).

A etiologia da neoplasia prostática é considerada espontânea em humanos, sendo evidente o envolvimento hormonal (BONKHOF et al., 1999).

Porém, de acordo com JOHNSTON et al. (2000), no cão, a depleção androgênica pós-orquiectomia resulta em involução de lesões proliferativas prostáticas benignas, mas não de carcinomas prostáticos, o que indica independência hormonal da lesão. Para TESKE et al. (2002), a castração não é responsável por iniciar a progressão tumoral, mas pode favorecer a mesma. Segundo MAHAPOKAI et al. (2000), o procedimento favorece o aumento no número de células basais e acredita-se que os carcinomas prostáticos mais agressivos tenham origem nestas células, que são andrógeno-independentes e sobrevivem e proliferam ativamente na ausência desses hormônios.

De acordo com LEROY & NORTHRUP (2009), o desenvolvimento em idade avançada, a concomitância com focos de PIN, a localização anatômica e a propensão para metástases ósseas compreendem fatores importantes quando se pondera o emprego do cão como modelo experimental adequado para o estudo do câncer prostático humano.

### **1.3. Metaloproteinases de matriz (MMP), inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) e remodelação da matriz extracelular nas lesões prostáticas proliferativas**

A matriz extracelular (MEC) consiste em uma complexa rede de macromoléculas que preenche os espaços intercelulares (BRASILEIRO FILHO, 2009) e desempenha papel fundamental na manutenção da estrutura e homeostase tecidual (HOJILLA et al., 2003). Este componente atua mantendo células e tecidos unidos, além de proporcionar substrato adequado para o crescimento e diferenciação dos mais variados tipos celulares do organismo (ALBERTS, 2009).

A MEC apresenta uma forma especializada, denominada membrana basal (MB) ou lâmina basal, sendo esta uma camada delgada e flexível de matriz extracelular que se organiza logo abaixo do epitélio ou envolvendo células musculares e adiposas, separando-as do tecido conjuntivo adjacente (BORNSTEIN & SAGE, 2002).

Na próstata canina a MB dá suporte à camada de células do epitélio basal que, por sua vez, sustenta o epitélio secretor (DORFMAN & BARSANTI, 1995; BARSANTI & FINCO, 1997). Ao contrário do que ocorre na glândula humana, em que a camada de células basais é contínua nos epitélios acinar e ductal, nos ácinos prostáticos caninos esta camada é descontínua e nos ductos contínua (LEAV et al., 2001).

A descontinuidade da MB está envolvida na evolução e progressão do câncer prostático humano (EPSTEIN, 1997; HELPAP, 1998). Além disso, a ruptura desta estrutura e a proteólise da MEC podem alterar a aderência celular, além de liberar fragmentos bioativos, dentre estes, fatores de crescimento e citocinas (MC CAWLEY & MATRISIAN, 2001; ORTEGA & WERB, 2002; SCHENK & QUARANTA, 2003), facilitando a invasão tumoral.

A degradação da MEC é mediada por proteinases extracelulares que incluem as serinaproteases, cisteinaproteases e metaloproteinases (MMP). Essas enzimas são fundamentais para o desenvolvimento e a progressão das neoplasias, haja vista que nos processos neoplásicos a regulação alterada da proteólise favorece a degradação da MEC e, conseqüentemente, o processo de metástase (BAKER et al., 2002; ITOH & NAGASE, 2002).

As metaloproteinases de matriz (MMP) compreendem um grupo de enzimas proteolíticas dependentes de cálcio e zinco que clivam ligações internas de peptídeos e, por isso, são denominadas endopeptidases (BRINCKERHOFF, 2002). A família das MMP apresenta mais de 25 enzimas que, de acordo com critérios estruturais e especificidade de substrato, são divididas em cinco grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10, MMP-11 e MMP-26), matrilisina (MMP-7) e metaloproteinases de membrana (MT1-MMP a MT6-MMP, também conhecidas como MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25, respectivamente) (VISSE & NAGASE, 2003; PAGE-MCCAW, 2007). Na Tabela 1 são apresentadas as principais MMP e seus respectivos substratos.

As metaloproteinases podem ser de dois tipos: secretadas (MMP) ou ligadas à membrana (MT-MMP). As MT-MMP são ligadas covalentemente à membrana celular enquanto as MMP secretadas localizam-se na superfície celular por meio de ligações com integrinas ou interação com proteoglicanas e

colágeno tipo IV (EGEBLAD & WERB, 2002). A ativação das MMP ocorre de maneira diferente em função dos tipos. Dessa forma, as secretadas são ativadas no meio extracelular e as de membrana no intracelular (RUNDHAUG, 2003).

As MMP degradam as macromoléculas da matriz, incluindo o colágeno intersticial, a fibronectina, a laminina e as proteoglicanas, sendo que, coletivamente, são capazes de degradar todos os componentes da MEC e da MB (BREHMER et al., 2003). Estas enzimas são amplamente distribuídas em indivíduos saudáveis, envolvendo-se em processos fisiológicos como cicatrização de feridas, reabsorção óssea, involução mamária e embriogênese. Além disso, estão envolvidas em processos patológicos como artrites e osteoartrites, enfermidades periodontais, fibrose hepática, doenças cardiovasculares, lesões proliferativas da próstata e alterações neoplásicas (WOESSNER & NAGASE, 2000).

As principais células responsáveis pela síntese e liberação das MMP são leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais, sendo a liberação dessas enzimas proteolíticas dependente de fatores de crescimento e citocinas (VISSE & NAGASE, 2003). Essas proteases são liberadas na forma de pró-enzimas inativas, chamadas zimógenos, que são ativadas no ambiente pericelular pela quebra proteolítica do domínio amino terminal rico em cisteína, sendo sua atividade dependente da presença de zinco (STAMENKOVIC, 2000).

Todas as MMP contêm íons  $Zn^{2+}$  no sítio de ação catalítica e requerem íons  $Ca^{2+}$  para sua estabilidade e atividade, sendo, por isso, denominadas enzimas metal dependentes (DE SOUZA & LINE, 2002).

Para a compreensão dos eventos relacionados ao desenvolvimento das neoplasias prostáticas e das lesões pré-neoplásicas, no que diz respeito a proteólise da MEC, as enzimas de maior interesse científico tem sido as gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), por degradarem especificamente a MB (BÖHLE & KALTHOFF, 1999). A MMP-2 é expressa por diversas células normais e neoplásicas e apresenta capacidade de degradar, além das gelatinas, alguns colágenos, laminina e TGF- $\beta$ . Já a gelatinase B ou MMP-9 é expressa por leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, queratinócitos e células endoteliais, atuando sobre colágenos, proteoglicanas e elastina. Por apresentar potente

capacidade de degradação dos componentes da MEC as gelatinases são consideradas agentes facilitadores de invasão tumoral e de metástases (BREHMER et al., 2003).

QUADRO 1 - Principais metaloproteinases de matriz e seus substratos.

| <b>Grupo</b>                         | <b>MMP</b>    | <b>Substrato</b>                                                                                                                         |
|--------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Colagenases</b>                   | MMP-1         | Colágenos tipo I, II, III, VII e X                                                                                                       |
|                                      | <b>MMP-8</b>  | Colágenos tipo I, II, III, VII e X                                                                                                       |
|                                      | <b>MMP-13</b> | Colágenos tipo I, II, III, IV, VII, X, XIV; tenascina, agrecan e fibronectina                                                            |
|                                      | MMP-18        | Colágenos tipo I, IV, V, X; laminina-5 e TGF- $\beta$                                                                                    |
| <b>Gelatinases</b>                   | MMP-2         | Gelatinas tipo 1, IV, V e X; laminina-5 e TGF- $\beta$                                                                                   |
|                                      | MMP-9         | Gelatinas tipo I, IV, V e X; laminina-5 e TGF- $\beta$                                                                                   |
| <b>Estromelisinases</b>              | MMP-3         | Colágenos tipo III, IV, IX e X; gelatina; pró-MMP-1; laminina; proteoglicano; fibronectina; elastina; E-caderina; percelana e pró-MMP-13 |
|                                      | <b>MMP-10</b> | Colágenos tipo III, IV, IX e X; gelatina; pró-MMP-1; laminina e proteoglicanos                                                           |
|                                      | MMP-11        | Alfa-1-antiprotease                                                                                                                      |
| <b>Matrilisina</b>                   | MMP-7         | Gelatina, fibronectina, pró-MMP-1; laminina e colágeno IV                                                                                |
| <b>Metaloproteinases de membrana</b> | MMP-14        | Pró-MMP-2; gelatina, colágenos, fibronectina e proteoglicanos                                                                            |
|                                      | <b>MMP-15</b> | Pró-MMP-2; fibronectina; tenascina e laminina                                                                                            |
|                                      | <b>MMP-16</b> | Pró-MMP-2; gelatina; colágeno III e fibronectina                                                                                         |

|               |                                              |
|---------------|----------------------------------------------|
| <b>MMP-17</b> | Não determinado                              |
| <b>MMP-24</b> | Não determinado                              |
| <b>MMP-25</b> | Colágeno IV, gelatina, fibronectina, fibrina |

Fonte: Adaptado de Rodaski & Piekarz (2009)

BREHMER et al. (2003) e ZHONG et al. (2008) observaram, por meio de imunoistoquímica, maior expressão de MMP-2 e MMP-9 em próstatas humanas neoplásicas do que naquelas histomorfologicamente normais ou com hiperplasia benigna, o que corrobora a capacidade de degradação das referidas gelatinases. Da mesma forma, FALEIRO (2010) observou maior expressão dessas enzimas em próstatas caninas acometidas por PIA, PIN e carcinoma.

A expressão das MMP em condições fisiológicas é fortemente regulada por três mecanismos: a transcrição, a ativação proteolítica da pró-enzima e a inibição da atividade enzimática (STAMENKOVIC, 2000; NABESHIMA et al., 2002). A maioria das metaloproteinases apresenta seus genes expressos somente quando a remodelação tecidual encontra-se ativa. Vários fatores estão envolvidos nesse tipo de regulação, incluindo citocinas, hormônios, fatores de crescimento e até mesmo fragmentos resultantes da clivagem da MEC por MMP (NABESHIMA et al., 2002). A ativação proteolítica das MMP é usualmente realizada por serinaproteinases, como a plasmina e a tripsina, e ocasionalmente por outras MMP, como acontece com a MMP-2, que é ativada pela MT1-MMP (LOUKOPOULOS et al., 2003).

A inibição da atividade enzimática das MMP é realizada pelos inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP), proteínas que atuam na manutenção da integridade da matriz extracelular por meio da sua atividade inibitória sobre as MMP (WOESSNER & NAGASE, 2000). Como a ação principal dos TIMP refere-se à inibição das MMP, podem atuar de modo a impedir ou retardar a invasão neoplásica e a ocorrência de metástases (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). Em humanos, acredita-se que as neoplasias apresentam reduzida expressão dos TIMP, em contrapartida, as MMP apresentam-se com expressão aumentada, o que evidencia a ação modulatória das proteínas TIMP sobre as MMP (PAGE-MCCAW et al., 2007).

Em humanos, acredita-se que ocorra aumento da expressão de MMP em tecidos malignos, enquanto os inibidores dessas enzimas (TIMP) estariam pouco expressos, o que resulta em aumento da atividade proteolítica (JOHNSEN et al., 1998; BÖHLE & KALTHOFF, 1999), que leva ao aumento da capacidade de invasão da MEC e disseminação da neoplasia ou ainda a evolução das lesões pré-malignas (MC CAWLEY & MATRISIAN, 2001).

A família de TIMP apresenta quatro proteínas (TIMP-1 a TIMP-4), que diferem em estrutura, propriedades bioquímicas, expressão e, conseqüentemente, funções biológicas (BREW et al., 2000; HAYAKAWA & YAMASHITA, 2003). Ressalte-se que a principal função fisiológica das proteínas TIMP relaciona-se à regulação da degradação da membrana basal e da MEC pelas MMP durante o desenvolvimento e a remodelação tecidual (HAYAKAWA & YAMASHITA, 2003). Apesar disso, são proteínas multifuncionais e também apresentam funções como modulação do crescimento, da proliferação, migração e invasão celular, bem como efeitos antiangiogênicos, estando a maioria dessas funções relacionada ao efeito inibitório das TIMP sobre as MMP (BREW & NAGASE, 2010).

À semelhança do que ocorre com as MMP, a expressão de TIMP no tecido durante remodelações teciduais e condições fisiológicas, também é controlada para que seja mantido o equilíbrio metabólico da MEC (GOMEZ et al., 1997), considerando que alterações nesse equilíbrio podem resultar em doenças associadas à degradação descontrolada da matriz (BREW et al., 2000).

Os TIMP são proteínas compostas por dois domínios, N-terminal e C-terminal, ambos estabilizados por três pontes dissulfídicas, sendo o domínio N-terminal capaz de ligar-se à MMP e formar uma ligação estável que proporciona inibição das atividades de remodelação da MEC (BREW & NAGASE, 2010).

Os TIMP podem inibir todos os tipos de MMP ativas. No entanto, há diferenças de afinidade entre os tipos de TIMP e MMP. O TIMP-1, por exemplo, apresenta atividade inibitória restrita em comparação aos outros três tipos de inibidores, já que possui afinidade relativamente baixa para as MMP ligadas à membrana, mas inibe fortemente MMP-7, MMP-9, MMP-1 e MMP-3 (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). De outra parte, a gelatinase B (MMP-2) é predominantemente inibida por TIMP-2 (BEE et al., 2000) e TIMP-4 (LIU et al., 1997). Acredita-se que o TIMP-3, além de agir na inibição das



gelatinases, apresenta a capacidade de estimular a apoptose, prevenindo o desenvolvimento neoplásico, enquanto que o TIMP-4 tem sido considerado um inibidor da invasão tumoral e de metástases, sendo capaz de inibir a atividade catalítica de MT1-MMP e MMP-2 (BREW & NAGASE, 2010).

BAKER et al. (2006) realizaram estudo utilizando amostras de carcinoma epidermoide oral de humanos e constataram que as metaloproteinases -1, -2 e -3 apresentavam maior expressão nos tecidos neoplásicos que nos histologicamente normais, enquanto que TIMP-1 e TIMP-2 não apresentaram diferença considerável de expressão entre tecido neoplásico e normal. Em contraste, ZHANG et al. (2002) estudaram a expressão de MMP e TIMP em células neoplásicas da próstata humana *in vitro* e observaram expressão elevada de MMP-2 e MMP-9 e reduzida de TIMP-1 e TIMP-2.

#### **1.4. Fator de Crescimento Transformador beta - TGF- $\beta$**

O fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) é uma citocina que se relaciona a uma variedade de processos biológicos como apoptose, tumorigênese, proliferação, diferenciação e expressão gênica (DERYNCK et al., 2001). A super família do TGF é composta por cinco membros, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3, - $\beta$ 4 e - $\beta$ 5, sendo todos reguladores multifuncionais da proliferação e diferenciação de uma variedade de tipos celulares. Destes, apenas o TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 e - $\beta$ 3 foram identificados nos mamíferos (PERALTA-ZARAGOZA, 2001).

A nomenclatura do TGF- $\beta$  foi determinada pela função atribuída a esta citocina de induzir a transformação e de inibir a proliferação de fibroblastos normais (DA CUNHA & VITKOVIC, 1992). O TGF- $\beta$  é responsável por inibir a proliferação de diversos tipos celulares, no entanto as linhagens epiteliais são as mais inibidas pela citocina. As células prostáticas neoplásicas são reconhecidamente moduladas pelo TGF- $\beta$  (LEE et al., 1999). Além disso, sabe-se que o TGF- $\beta$  apresenta ainda a função de induzir a apoptose (MA et al., 2005).

O TGF- $\beta$  é sintetizado por diferentes células, incluindo linfócitos, macrófagos, fibroblastos, células musculares lisas, condrócitos, astrócitos, células epiteliais, plaquetas, e ainda por células tumorais. Acredita-se que as isoformas

TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 2 sejam expressas por diversos tipos celulares, enquanto a TGF- $\beta$ 3 é expressa apenas por células mesenquimais (BARNARD et al., 1990).

Nos humanos, as células da próstata expressam as três isoformas de TGF- $\beta$ , contudo, maior expressão do TGF- $\beta$ 1 vem sendo relatada. Em baixas concentrações o TGF- $\beta$  promove proliferação das células estromais prostáticas, ao passo que em altas concentrações inibe a proliferação das mesmas. Por esse motivo, acredita-se que o TGF seja um mediador do crescimento prostático (ZHOU et al., 2003).

WU et al. (2001) desenvolveram estudo em que objetivavam verificar os efeitos da episteride, uma droga utilizada no controle da HPB em humanos, na expressão de IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina) e TGF- $\beta$  em próstata de ratos castrados. Os autores concluíram que o tratamento leva ao aumento na expressão de TGF- $\beta$ , enquanto o IGF-1 tem sua expressão diminuída. Isso permitiu aos autores inferir que o IGF-1 age como estimulante da proliferação celular e o TGF- $\beta$  atua na regulação negativa desta proliferação.

O TGF- $\beta$  está envolvido em vários aspectos da carcinogênese. No início do desenvolvimento neoplásico esta citocina apresenta a função de inibir a proliferação das células. Com a progressão da neoplasia, esse fator de crescimento passa a aumentar a motilidade das células neoplásicas, predispondo a ocorrência de metástases (DERYNCK et al., 2001; DANIELPOUR, 2005). Em experimento realizado por PANG et al. (2011), utilizando neoplasia de mama canina, verificou-se que o TGF- $\beta$  apresenta capacidade de induzir a transformação de células epiteliais para mesenquimais, o que aumentaria a malignidade tumoral.

De acordo com LEE et al. (1999), o modo de ação do TGF- $\beta$  no tecido prostático é variável. Na hiperplasia prostática benigna, a referida citocina age mantendo a homeostase epitelial. Já no câncer de próstata, além do TGF- $\beta$  apresentar-se em quantidade reduzida, as células neoplásicas desenvolvem resistência a essa citocina, o que aumenta a possibilidade de desenvolvimento tumoral.

RODRIGUES et al. (2010) realizaram estudo das lesões proliferativas da próstata do cão utilizando dois marcadores, COX-2 e TGF- $\beta$ , e verificaram grande expressão dos mesmos nas neoplasias. Observaram ainda que nas

hiperplasias estromais a expressão de TGF- $\beta$  é maior do que nas epiteliais, o que, de acordo com NIU et al. (2001), ocorreria devido ao acúmulo de TGF- $\beta$  nas células estromais e contribuiria para a proliferação celular e progressão das lesões proliferativas.

## REFERÊNCIAS

1. ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2009. 1549p.
2. APPARÍCIO, M.; VICENTE, W.R.R.; PIREZ, E.A.; MOSTACHIO, G.Q.; RIBEIRO, A.P.C.; COVIZZI, G.J.; GADELHA, C.R.F.; CARVALHO, M.B. Omentalização prostática em cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, n.6, p.754-761, 2006.
3. 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. **The Prostate**, New York, n.36, p.189–193, 1998.
4. BAKER, A.H.; EDWARDS, D.R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal Cellular Science**, Washington, v.115, p.3719-3727, 2002.
5. BAKER, E.A.; LEAPER, D.J.; HAYTER, J.P.; DICKENSON, A.J. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, London, v.44, p.482–486, 2006.
6. BARNARD, J.A.; LYONS, R.M.; MOSES, H.L. The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1032, p.79-87, 1990.
7. BARSANTI, J.; FINCO, D. R. Moléstias prostáticas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 128, v.2, p.2294-2325.
8. BARSANTI, J.A. Diseases of the prostate gland. In: Osborne, C.A., Finco, D.R. (Eds.), **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Williams and Wilkins, Baltimore, 1995, p. 746–749.

9. BEE, A.; BARNES, A.; JONES, M.D.; ROBERTSON, D.H.; CLEGG, P.D.; CARTER, S.D. Canine TIMP-2: purification, characterization and molecular detection. **The Veterinary Journal**, London, v.160, n.1, p.126–134, 2000.
10. 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). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.199, n.11, p.1623-1630, 1991.
11. BILLIS, A.; MAGNA, L.A. Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Chicago, v. 127, n. 7, p. 840-844, 2003.
12. BÖHLE, A.S.; KALTHOFF, H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. **Langenbeck's archives of surgery**, Berlin, v.384, n.2, p.133-140, 1999.
13. BONKHOFF, H.; FIXEMER, T.; HUSICKER, I.; REMBERGER, K. Estrogen receptor expression in prostate cancer and premalignant prostatic lesions. **American Journal of Pathology**, Bethesda, v.155, n.2, p.641-647, 1999.
14. BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.14, p.608-616, 2002.
15. BOSTWICK, D.G. Neoplasms of the prostate. In: BOSTWICK, D.E., EBLE, J.N. **Urologic Surgical Pathology**. St. Louis: Mosby; 1997. p.343-421.
16. BOSTWICK, D.G; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern Pathology**, Baltimore, v.17, n.3, p.360-379, 2004.
17. BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology – Science Direct**, Bethesda, 2010, 8p.
18. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 1488p.
19. BREHMER, B.; BIESTERFELD, S.; JAKSE, G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in

- prostate cancer tissue. **Nature - Prostate Cancer and Prostatic diseases**, USA, v.6, p.217-222, 2003.
20. BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1477, p.267-283, 2000.
  21. BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1803, p.55-71, 2010.
  22. BRINCKERHOFF, C.E.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. **Nature Reviews/Molecular Cell Biology**, London, v.3, p.207-14, 2002.
  23. CASTELLUCCI, E.; PAMPINELLA, F.; FAGGIAN, L.; GARDIMAN, M.; PAGANO, F.; SARTORE, S. Cytoskeletal and cytocontractile protein composition of stromal tissue in normal, hyperplastic and neoplastic human prostate. **Annals New York Academy of Sciences**, New York, v.30, p.496-508, 1996.
  24. 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 pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, New York, v.45, n.1, p.173-183, 2000.
  25. DA CUNHA, A.; VITKOVIC, L. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta) expression and regulation in rat cortical astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.36, p.157-169, 1992.
  26. DANIELPOUR, D. Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in the prostate. **European Journal of Cancer**, New York, v.41, p.846-857, 2005.
  27. DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; EPSTEIN, J. I.; ALI, T.; BILLIS, A.; CHAN, T. Y.; CHENG, L.; DATTA, M.; EGEVAD, L.; ERTÖY-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. **American Journal of Surgical Pathology**, New York, v.30, n.10, p.1281-1291, 2006.
28. DE MARZO, A.; MEEKER, A.K.; ZHA, S.; LUO, J.; NAKAYAMA, M.; PLATZ, E.A.; ISSACS, W.B.; NELSON, W.G. Human prostate cancer precursors and pathobiology, **Urology**, Secaucus, v.62, p. 55-62, 2003.
  29. DE MARZO, A.M.; COFFEY, D.S.; NELSON, W.G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Urology**, Secaucus, v.53, suppl. 3A; p.29-40, 1999.
  30. DE SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of Matrix Metalloproteinases. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.1-6, 2002.
  31. DERYNCK R, AKHURST RJ, BALMAIN A: TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**, New York, v.29, p.117-129, 2001.
  32. 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.
  33. DORFMAN, M.; BARSANTI. J. Diseases of the canine prostatic gland. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.**, Beltsville, v.17, n.6, p.791- 811, 1995.
  34. EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the Matrix Metalloproteinase in Cancer Progression. **Nature Reviews/Cancer**, London v.2, p.161-174, 2002.
  35. EPSTEIN, J.I. Non-neoplastic diseases of the prostate. In: BOSTWICK, D.E., EBLE, J.N. **Urologic Surgical Pathology**, St Louis: Mosby. 1997. p.307-316.
  36. FALEIRO, M.B.R. **Expressão de MMP-2, MMP-9 e upar- em próstatas caninas normais e com HPB, PIA, PIN e carcinoma**. Goiânia, 2010, 97p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.
  37. FONSECA ALVES, C.E.; FALEIRO, M.B.R.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Avaliação histopatológica da próstata canina de cães

- adultos sexualmente intactos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.3, p.596-602, 2010.
38. GOMEZ, D. E.; ALONSO, D. F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U. P. Tissue inhibitor of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. **European journal of cell biology**, Jena, v.74, n.2, p.111-122, 1997.
  39. HAYAKAWA, T.; YAMASHITA, K. Structures and functions of tissue inhibitors of metalloproteinases. In: **Extracellular Matrix and the Liver - IV. Basic Science of MMPs and TIMPs**, USA: Elsevier Science, p.309-329, 2003.
  40. HELPAP, B. Differential diagnosis of glandular proliferations in the prostate. A conventional and immunohistochemical approach. **Virchows Archives**, Berlin, v. 433, p. 397- 405, 1998.
  41. HOJILLA, C.V.; MOHAMMED, F.F.; KHOKHA, R. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. **Brazilian Journal of Cancer**, São Paulo, v.89, p.1817-1821, 2003.
  42. HUMPHREY, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**, Baltimore, n.17, p.292-306, 2004.
  43. ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochemistry**, Portland, v.38, p.21-36, 2002.
  44. JOHNSEN, M.; LUND, R.L.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common Themes in proteolytic matrix degradation. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.10, p.667-671, 1998.
  45. JOHNSTON, S.D.; KAMOLPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.; JONHSTON, G.R. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.405-415. 2000.
  46. JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.R.; OLSON, P.M.S. Sexual differentiation and normal anatomy of the do. In \_\_\_\_\_. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 2001. 592p.
  47. KUTZLER, M.; YEAGER, A. Prostatic diseases. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. (Eds.). **Textbook of veterinary internal medicine**. 6 ed. St. Louis: WB Saunders, 2005, p.1809-1819.
  48. LEAV, I.; SCHELLING, K.H.; ADAMS, J.Y.; MERK, F.B.; ALROY, J. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of

- hyperplasia, sex hormone stimulated growth; and the ductal origin of carcinoma. **The Prostate**, New York , v.47, n.1, p.149- 163, 2001.
49. LEE, C.; SINTICH, S.M.; MATHEWS, E.P.; SHAH, A.H.; KUNDU, S.D.; PERRY, K.T.; CHO, J.S.; ILIO, K.Y.; CRONAUER, M.V.; JANULIS, L.; SENSIBAR, J. Transforming growth factor- $\beta$  in benign and malignant prostate. **The Prostate**, New York, v.39, p.285-290, 1999.
  50. LEROY, B.E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects **The Veterinary Journal**, London, v.180, n.2, p.149–162, 2009.
  51. LIU, Y.E.; WANG, M.; GREENE, J.; SU, J.; ULLRICH, S.; LI, H.; SHENG, S.; ALEXANDER, P.; QINGXIANG AMY SANG; SHI, Y.E. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). **The Journal of biological chemistry**, Bethesda; v.272, n.33, p.20479–20483, 1997.
  52. LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B.A.; STRAW, R.C.; THORNTON, J.R.; ROBINSON, W.F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology**. Lawrence, v.40, n.4, p.382–394, 2003.
  53. MA, Q.J.; GU, X.Q.; CAO, X.; ZHAO, J.; KONG, X.B.; LI, Y.X.; CAI, S.Y. Effect of  $\beta$  radiation on TGF- $\beta$ 1 and bFGF expression in hyperplastic prostatic tissues. **Asian Journal of Andrology**, China, v.1, p.49-54, 2005.
  54. MACLACHAN, N.J.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: Meuten, D.J. (Ed.), **Tumors in Domestic Animals**. Iowa State University Press, Ames, IA, 2002, p.568–570.
  55. MADEWELL, B.R.; GANDOUR-EDWARDS, R.; DEVERE WHITE, R.W. Canine prostatic intraepithelial neoplasia: is the comparative model relevant? **The Prostate**, New York, v.58, n.3, p.314–317, 2004.
  56. MAHAPOKAI, W.; XUE, Y.; VAN GARDEREN, E.; VAN SLUIJS, F.J.; MOL, J.A.; SCHALKEN, J.A. Cell kinetics and differentiation after hormonal-induced prostatic hyperplasia in the dog. **The prostate**, New York, v.44, n.1, p.40-48, 2000.
  57. MCCAWLEY, L.J.; MATRISIAN, L.M. Matrix metaloproteinases: They're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.13, n.5, p.534-540, 2001.



58. MURAKOSHI, M.; IKEDA, R.; TAGAWA, M.; NAKAYAMA, T.; HONMA, S.; MIEDA, M. Immunolocalization of androgen receptor in canine prostatic hyperplasia - effect of antiandrogen. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, Tokyo, v.23, n.5, p.209-212, 1998.
59. MURASHIMA JÚNIOR, J.C. **Mensuração da próstata por ultra-sonografia transabdominal, e sua associação com a massa corpórea de cães adultos e clinicamente sadios**. Botucatu, 2001. 47p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 2001.
60. NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, London, v.54, p.255-264, 2002.
61. NIU, Y.; XU, Y.; ZHANG, J.; BAI, J.; YANG, H.; MA, T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **British Journal of Urology**, Oxford, v.87, p.386-393, 2001.
62. ORTEGA, N.; WERB, Z. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. **Journal of Cell Science**, London, v.115, n.22, p.4201-4214, 2002.
63. O'SHAUGHNESSY, J.A.; KELLOFF, G.J.; GORDON, G.B. ; DANNENBERG, A.J.; WAUNKI HONG; FABIAN, C.J.; SIGMAN, C.C.; BERTAGNOLLI, M.M.; STRATTON, S.P.; LAM,S.; NELSON, W.G.; MEYSKENS, F.L.; ALBERTS, D.S.; FOLLEN, M.; RUSTGI, A.K.; PAPADIMITRAKOPOULOU, V.; SCARDINO, P.T.; GAZDAR, A.F.; WATTENBERG, L.W.; SPORN, M.B.; SAKR, W.A.; LIPPMAN, S.M.; VON HOFF, D.D. Treatment and prevention of intraepithelial neoplasia: An important target for accelerated new agent development. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v.8, n.2, p.314-46, 2002.
64. PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews/Molecular Cell Biology**, London, v.8, n.3, p.221-233, 2007.
65. 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**, Oxford, v.26, n.7, p.1170-1181, 2004.
66. PANG, L.Y.; CERVANTES-ARIAS, A.; ELSE, R.W.; ARGYLE, D.J. Canine mammary cancer stem cells are radio- and chemo- resistant and exhibit an epithelial-mesenchymal transition phenotype. **Cancers**, Switzerland v.3, p. 1744-1762, 2011.
  67. PERALTA-ZARAGOZA, O.; LAGUNAS-MARTINEZ, Q.B.P.A; MADRIDMARINA, M.V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, function y mecanismo de regulacion en cancer. **Salud pública de México**, México, v.43, n.4, 2001.
  68. PLATZ, E.A.; DE MARZO, A.M. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. **Journal of Urology**, Baltimore, v.171, p. S36-S40, 2004.
  69. PUTZI, M.J.; DE MARZO, A.M. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Urology**, Secaucus, v.56, p.828-832, 2000.
  70. RODASKI, S.; PIEKARZ, C.H. Biologia do câncer. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p.23-51, 2009.
  71. RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; DE MOURA, V.M.B.D.; LAUFER-AMORIM, R. COX-2 and TGF- $\beta$  expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.3, p. 31-36, 2010.
  72. RUNDHAUG, J.E. Matrix metalloproteinases, angiogenesis and cancer. **Clinical Cancer Research**, Atlanta v.9, p.551-554, 2003.
  73. SCHENK, S.; QUARANTA, V. Tales from the cryptic sites of the extracellular matrix. **Trends Cellular Biology**, Cambridge, v.13, n.7, p.366-375, 2003.
  74. SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v.70, n.3, p.375–383, 2008.
  75. STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, Boston, v.10, p.415-433, 2000.
  76. 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Ireland, v.197,n.1, p.251/255, 2002.
77. TOLEDO, D.C.; FALEIRO, M.B.R.; RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1372-1377, 2010.
  78. TOMAS, D.; KRUSLIN, B.; ROGATSCH, H.; SCHAFER, G.; BELICZA, M.; MIKUZ, G. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. **Europea Urology**, Basel, v.51, n.1, p.98-104, 2007.
  79. VANNUCCHI, C.I.; VENTURA, P.C.N.; SATZINGER, S. Afecções prostáticas em cães: sinais clínicos, diagnostico e tratamento. **Clínica Veterinária**, ano II, n.11, p. 37-42, 1997.
  80. VISSE, R. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v.92, n.8, p.827–829, 2003.
  81. WATERS, D.J.; BOSTWICK, D.G. The canine prostate is a spontaneous model of intraepithelial neoplasia and prostate cancer progression. **Anticancer Research**, Athens, v.17, n. 3A, p.1467–1470, 1997.
  82. WINTER, M.D.; LOCKE, J.E.; PENNINCK, D.G. Imaging diagnosis– urinary obstruction secondary to prostatic lymphoma in a young dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Raleigh, v.47, n.6, p.597–601, 2006.
  83. WOESSNER, J.F.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. **Oxford University Press**, New York, p.130-135, 2000.
  84. WU, S.F.; SUN, H.Z.; QI, X.D.; TU, Z.H. Effect of episteride on the expression or IGF-1 e TGF- $\beta$  receptors in androgen-induced castrated rat prostate. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v.226, p. 954-960, 2001.
  85. ZHANG, J.; JUNG, K.; LEIN, M.; KRISTIANSEN, G.; RUDOLPH, B.; HAUPTMANN, S.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A.; LICHTINGHAGEN, R. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines. **The Prostate**, New York, v.50, p.38-45, 2002.
  86. ZHONG, W.; HAN, Z.D.; HE, H.C.; BI, X.C.; DAÍ, Q.S.; ZHU, G.; YE, Y.K.; LIANG, Y.X.; QIN, W.J.; ZHANG, Z.; ZENG, G.H.; CHEN, Z.N. CD147, MMP-

- 1, MMP-2 and MMP-9 Protein Expression as Significant Prognostic Factors in Human Prostate Cancer. **Oncology, International Journal of Cancer Research and Treatment**, Basel, n.75, p.230-236, 2008.
87. ZHOU, W.; PARK, I.; PINS, M.; KOZLOWSKI, J.M.; JOVANOVIĆ, B.; ZHANG, J.; LEE, C.; ILIO, K. Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor- $\beta$ 1. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, p.4280-4284, 2003.

## **CAPÍTULO 2 - EXPRESSÃO DE INIBIDORES TECIDUAIS DE METALOPROTEINASES 1 E 2 EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

### **RESUMO**

Os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) são fatores responsáveis pela regulação da ação catalítica das metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas com capacidade de degradar todos os componentes da matriz extracelular (MEC). Por isso, as MMP são consideradas fundamentais no desenvolvimento das lesões proliferativas que acometem a próstata, que podem ser benignas (hiperplasia prostática benigna - HPB), pré-malignas (atrofia inflamatória proliferativa - PIA, e neoplasia intraepitelial prostática - PIN) e malignas (adenocarcinoma). Dentre os tipos de MMP, as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são as consideradas com maior capacidade de degradação da MEC e, por isso, agentes facilitadores da invasão tumoral e metástases. O TIMP-1 e o TIMP-2 inibem MMP-9 e MMP-2, respectivamente. O objetivo deste estudo foi verificar a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 comparando a mesma no tecido prostático normal e com lesões proliferativas. Para isto, foram colhidas, em exames necroscópicos, 150 próstatas de cães adultos e idosos, e selecionadas 54 glândulas com histomorfologia normal, HPB epitelial, HPB estromal, PIA, PIN e adenocarcinoma, das quais foram extraídos fragmentos utilizados para confecção de um bloco de microarranjo tecidual (*Tissue Microarray* - TMA). As lâminas de TMA foram submetidas à técnica de imunoistoquímica com os anticorpos anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2, sendo avaliada a intensidade de marcação nas células epiteliais e estromais. Houve variação na expressão de TIMP-1 e TIMP-2 na próstata canina de acordo com o tipo celular (epitelial e estromal) e a lesão. As células do estroma prostático expressaram TIMP-1 enquanto as células epiteliais acinares não apresentaram resultados imunoistoquímicos relevantes. Para TIMP-2 ocorreu o inverso, expressão nas células epiteliais e expressão menos significativa no estroma periacinar.

Palavras-chave: cão, HPB, PIN, PIA, carcinoma, TIMP-1, TIMP-2.

## **CHAPTER 2 - EXPRESSION OF TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASE 1 AND 2 IN NORMAL CANINE PROSTATE AND WITH PROLIFERATIVE LESIONS**

### **ABSTRACT**

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) are responsible for regulating the catalytic action of matrix metalloproteinases (MMP) that has the ability to degrade all components of the extracellular matrix (ECM). Due to this degradation capability, MMP are considered essential in the development of proliferative lesions affecting the prostate. These lesions can be benign (benign prostatic hyperplasia -BPH), premalignant (proliferative inflammatory atrophy – PIA – and prostatic intraepithelial neoplasia - PIN) and malignant (adenocarcinoma). Among the types of MMP, the gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are those having greater capacity of degrade ECM and considered facilitating agents of tumor invasion and metastasis. The TIMP-1 and TIMP-2 inhibit MMP-9 and MMP-2, respectively. The objective of this research was to investigate the expression of TIMP-1 and TIMP-2 comparing normal prostate tissue and tissue with proliferative lesions. We collected 150 adult and elderly canine prostates obtained from postmortem examinations. It was evaluated histologically and 54 glands compatible with normal, epithelial BPH, stromal BPH, PIA, PIN and adenocarcinoma were selected, all used for making tissue microarray block (Tissue Microarray - TMA). The TMA slides were subjected to immunohistochemistry with anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 and the staining intensity of epithelial and stromal cells was evaluated. There was variation in the expression of TIMP-1 and TIMP-2 in canine prostate according to cellular type (epithelial and stromal) and lesion. Prostate stromal cells express TIMP-1 and acinar epithelial cells had no immunohistochemical relevant results. The opposite was observed forTIMP-2: expression in epithelial cells and no significant expression in stromal periacinar cells.

**keywords:** Dog, BPH, PIN, PIA, carcinoma, tissue inhibitors of metalloproteinase.

## INTRODUÇÃO

Doenças prostáticas desenvolvem-se com frequência em cães, especialmente nos não castrados, adultos e idosos (FONSECA ALVES et al., 2010). As lesões proliferativas da próstata do cão são: hiperplasia prostática benigna (HPB), atrofia inflamatória proliferativa (PIA), neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e adenocarcinoma (RODRIGUES et al., 2010; FONSECA ALVES et al., 2010; TOLEDO et al., 2010).

A HPB compreende uma proliferação epitelial e/ou estromal benigna e hormonalmente induzida (TESKE et al., 2002). A PIA consiste em lesão displásica e proliferativa do epitélio prostático, concomitante a diversos graus de inflamação intersticial adjacente, sendo frequente na próstata humana (DE MARZO et al., 1999) e também descrita na glândula do cão (RODRIGUES et al., 2010; TOLEDO et al., 2010).

A PIN é uma lesão displásica não-invasiva da próstata que apresenta anormalidades genéticas, perda de controle das funções celulares e características fenotípicas de câncer (BILLIS & MAGNA, 2003). As neoplasias prostáticas nos cães geralmente são epiteliais malignas e, muitas vezes, apresentam estrutura glandular ou acinar, sendo classificadas como adenocarcinomas (CORNELL et al., 2000).

A invasão tumoral ocorre em etapas, uma delas caracterizada pela interação entre as células neoplásicas e a matriz extracelular (MEC) (BORNSTEIN & SAGE, 2002). As metaloproteinases de matriz (MMP) são enzimas responsáveis pela degradação da maioria dos componentes da MEC, agindo tanto nos processos fisiológicos como nos patológicos (WOESSNER & NAGASE, 2000). Regulando a atividade das MMP, os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP) auxiliam na manutenção da integridade da MEC (VISSE & NAGASE, 2003; PARKS et al., 2004; PAGE MCCAW et al., 2007). Os TIMP também atuam como moduladores do crescimento celular, antagonistas da angiogênese e protetores celulares contra a apoptose (BREW et al., 2000).

As MMP classificadas como gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são comumente envolvidas no desenvolvimento das lesões prostáticas (STEARNS & WANG, 1996), e moduladas por TIMP-2 e TIMP-1, respectivamente. Acredita-se que em tumores malignos ocorra aumento na expressão de MMP e diminuição na

expressão de TIMP, o que resulta em aumento da atividade proteolítica da MEC (JOHNSEN et al., 1998; BÖHLE & KALTHOFF, 1999).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o tecido prostático canino normal e com lesões proliferativas (HPB, PIA, PIN e carcinoma), comparando-os quanto a expressão de TIMP-1 e TIMP-2, bem como, verificar se há correlação de expressão entre os marcadores e o diagnóstico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material e avaliação histomorfológica**

Foram colhidas 150 próstatas de cães adultos, não castrados, com ou sem histórico clínico de doença prostática e provenientes da rotina necroscópica do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO e do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

Após a colheita, as glândulas foram identificadas e inicialmente seccionadas em um corte transversal na porção média, para melhor penetração do fixador. Quando muito grandes, eram realizados dois cortes obtendo-se três porções, cranial (PCr), média (PM) e caudal (PCa).

As glândulas foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 48 horas, recortadas, acondicionadas em cassetes e mantidas em álcool 70° até o processamento e inclusão em parafina. Após a inclusão foram confeccionados cortes de 3µm, estes distendidos em lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação histomorfológica.

Na avaliação histomorfológica foram selecionadas amostras de próstatas normais (n=7) e com lesões proliferativas, estas de acordo com critérios de FONSECA ALVES et al. (2010) para HPB (epitelial n=10 e estromal n=6), TOLEDO et al. (2010) para PIA (discreta n=5, moderada n=6 e acentuada n=5), BOSTWICK & QIAN (2004) para PIN (n=7) e SUGAR (2006) para carcinoma (n=8), totalizando 54 próstatas. A análise foi realizada em microscópio óptico,



inicialmente em menor aumento (32x), seguindo aos aumentos de 100x, 250x e 400x.

### **Microarranjo tecidual (*Tissue Microarray* – TMA)**

As amostras provenientes das 54 próstatas foram utilizadas para a confecção do bloco de microarranjo tecidual (TMA) e posterior realização da técnica de imunoistoquímica. As amostras foram devidamente marcadas nas lâminas de referência (HE) e identificadas nos blocos doadores, dos quais foram retirados cilindros (*cores*) de 1mm de diâmetro (*Tissue MicroArray builder* 20010.2, Histopathology Ltd, Hungria) correspondentes às áreas marcadas, e transferidos para o bloco receptor (TMA), conforme descrito por KONONEN et al. (1998) e BUBENDORF et al. (2001). Neste bloco também foi incluída uma amostra de placenta humana normal para a orientação da leitura das amostras nas lâminas de TMA.

Do bloco de TMA foram obtidos cortes de 3µm, estes distendidos sobre lâminas silanizadas (Starfrost White, Sakura, ready to use, Germany – Dako 9545-1) e submetidos à coloração de HE para a confirmação da presença das lesões selecionadas na avaliação histomorfológica, e à técnica de imunoistoquímica para a avaliação da expressão de TIMP-1 e TIMP-2.

### **Imunoistoquímica**

Duas lâminas de TMA foram desparafinizadas e diafanizadas em três imersões sequenciais de xilol, por 30 minutos cada, a temperatura ambiente. Em seguida, foram submetidas a passagens sequenciais em álcool (100% $\times$ 3, 95% $\times$ 1, 85% $\times$ 1 e 70% $\times$ 1), durante cinco minutos cada. Na etapa seguinte, com o intuito de reduzir coloração de fundo, as lâminas foram incubadas por cinco minutos em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) em PBS 1% e lavadas em água destilada.

Para a recuperação antigênica as lâminas foram submersas em solução tampão citrato pH6.0, a 121°C, durante três minutos, em panela de pressão (Pascal, *Dako Cytomation*). Após o arrefecimento foram lavadas em água

destilada e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena por imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 10% (10ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/90ml de metanol), por 10 minutos. Seguiram-se o bloqueio de marcações inespecíficas em solução de leite em pó desnatado a 10% (Molico® -10g/100 ml H<sub>2</sub>O destilada), durante uma hora e trinta minutos, e a incubação com os anticorpos primários diluídos (Diluidor de anticorpos, ADS-125, Spring) a 1:100 (anti-TIMP-1, *Rabbit Anti-Human TIMP-1 Polyclonal Antibody* - Spring) e 1:150 (anti-TIMP-2, *Rabbit Anti-Human TIMP-1 Polyclonal Antibody* - Spring), em câmara úmida, por 18 horas (*overnight*), a temperatura de 4°C. Nas lâminas utilizadas como controle negativo os anticorpos primários foram substituídos por solução tampão TRIS pH7.4.

As etapas seguintes consistiram da incubação com anticorpo secundário (Advance System, Dako K4068), em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, e da revelação da reação em solução de diaminobenzidina (DAB, Dako K3468-1), por três minutos. Entre todas as etapas as lâminas foram lavadas em solução tampão TRIS pH7,4.

Seguiram-se a contracoloração em hematoxilina de Harris durante 20 segundos, a lavagem em água destilada, a desidratação em banhos sequenciais e álcool (85%x1, 95%x1 e 100%x3), por cinco minutos cada, banhos sequenciais de xilol, durante cinco minutos cada, e a montagem das lâminas com lamínulas e resina sintética, para posterior análise em microscópio óptico.

### **Análise estatística**

A avaliação dos resultados foi realizada de forma semi-quantitativa por meio de escores. Foi avaliada a intensidade de marcação das células epiteliais e estromais periacinares, utilizando o escore zero para ausência de marcação, um, dois e três para as marcações discreta, moderada e acentuada, respectivamente. As amostras foram analisadas por um avaliador, sendo realizada observação prévia de cada fragmento seguida por duas observações em que os escores de classificação foram estabelecidos para cada um dos fragmentos amostrados (Quadro 1).

As análises dos dados obtidos no estudo imunoistoquímico foram realizadas por meio do teste Kruskal-Wallis para a análise da variável intensidade

de marcação dos anticorpos entre os diagnósticos. A Correlação de Spearman foi realizada para correlacionar a expressão dos anticorpos, TIMP-1 e TIMP-2, em próstatas normais e com lesões proliferativas. Os dados foram processados nos programas Excel 2010 e SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 16.0, sendo considerado efeito significativo quando  $p < 0.05$ .

QUADRO 1 – Escores utilizados para classificação da intensidade de marcação de células epiteliais e estromais da próstata canina.

| <b>Escore</b> | <b>Critérios</b>                                                                                    |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Zero</b>   | Ausência de marcação                                                                                |
| <b>Um</b>     | Marcação discreta no citoplasma celular, leve coloração acastanhada no citoplasma das células       |
| <b>Dois</b>   | Marcação moderada no citoplasma celular, coloração marrom clara observada no citoplasma das células |
| <b>Três</b>   | Marcação acentuada no citoplasma celular, coloração marrom intensa no citoplasma das células        |

## RESULTADOS

As células epiteliais e estromais da próstata canina normal e com lesões proliferativas apresentaram marcação citoplasmática para o anticorpo anti-TIMP-1. O escore de intensidade de marcação variou de zero a três de acordo com o tipo celular (epitelial ou estromal) e o diagnóstico (Figura 1).

Aplicando-se o Teste Kruskal Wallis aos escores determinados não houve diferença significativa entre os diferentes tipos histológicos considerados quanto a expressão de TIMP-1 em células epiteliais acinares da próstata de cães. Em contrapartida, na comparação entre os diagnósticos em relação à variável intensidade de células estromais periacinares marcadas para TIMP-1 houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), com maior expressão nas próstatas com HPB estromal e PIN em relação às normais. Comparando os tipos de PIA, não foi observada diferença estatística entre as mesmas (Tabela 1).

Na Figura 2 pode-se observar a distribuição dos escores de intensidade de marcação de TIMP-1 nas células do estroma prostático nos diferentes diagnósticos. Todos os focos de PIA, PIN e carcinoma apresentaram marcação pelo anticorpo TIMP-1, e essas lesões foram as que apresentaram maior proporção de escore três (marcação em intensidade acentuada).

TABELA 1 – Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação pelo anticorpo TIMP-1 nas células epiteliais acinares e estromais em relação ao diagnóstico.

| CÉLULAS EPITELIAIS (p=0,238) |          |       |          |       |          |       |           |       |
|------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| DIAGNÓSTICO                  | Negativo |       | Discreta |       | Moderada |       | Acentuada |       |
|                              | N        | %     | n        | %     | n        | %     | n         | %     |
| NORMAL                       | -        | 0,0   | 3        | 16,7  | 2        | 16,7  | 2         | 18,2  |
| HPB EPITELIAL                | 2        | 15,4  | 2        | 11,1  | 2        | 16,7  | 4         | 36,4  |
| HPB ESTROMAL                 | 1        | 7,7   | 4        | 22,2  | 1        | 8,3   | -         | 0,0   |
| PIN                          | 4        | 30,8  | 2        | 11,1  | 1        | 8,3   | -         | 0,0   |
| CARCINOMA                    | 2        | 15,4  | 3        | 16,7  | 2        | 16,7  | 1         | 9,1   |
| PIA DISCRETA                 | 1        | 7,7   | 2        | 11,1  | 1        | 8,3   | 1         | 9,1   |
| PIA MODERADA                 | 2        | 15,4  | 1        | 5,6   | 3        | 25,0  | -         | 0,0   |
| PIA ACENTUADA                | 1        | 7,7   | 1        | 5,6   | -        | 0,0   | 3         | 27,3  |
| Total                        | 13       | 100,0 | 18       | 100,0 | 12       | 100,0 | 11        | 100,0 |
| CÉLULAS ESTROMAIS (p=0,034)  |          |       |          |       |          |       |           |       |
| DIAGNÓSTICO                  | Negativo |       | Discreta |       | Moderada |       | Acentuada |       |
|                              | N        | %     | n        | %     | n        | %     | n         | %     |
| NORMAL <sup>A</sup>          | 1        | 16,7  | 1        | 7,7   | 3        | 20,0  | 2         | 10,0  |
| HPB EPITELIAL <sup>B</sup>   | 4        | 66,7  | 2        | 15,4  | 4        | 26,7  | -         | 0,0   |
| HPB ESTROMAL <sup>C,A</sup>  | 1        | 16,7  | 2        | 15,4  | 2        | 13,3  | 1         | 5,0   |
| PIN <sup>D,A</sup>           | -        | 0,0   | 1        | 7,7   | 1        | 6,7   | 5         | 25,0  |
| CARCINOMA <sup>E</sup>       | -        | 0,0   | 1        | 7,7   | 2        | 13,3  | 5         | 25,0  |
| PIA DISCRETA <sup>F</sup>    | -        | 0,0   | 1        | 7,7   | 1        | 6,7   | 3         | 15,0  |
| PIA MODERADA <sup>G</sup>    | -        | 0,0   | 3        | 23,1  | 1        | 6,7   | 2         | 10,0  |
| PIA ACENTUADA <sup>H</sup>   | -        | 0,0   | 2        | 15,4  | 1        | 6,7   | 2         | 10,0  |
| Total                        | 6        | 100,0 | 13       | 100,0 | 15       | 100,0 | 20        | 100,0 |

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os diagnósticos que tais letras representam.

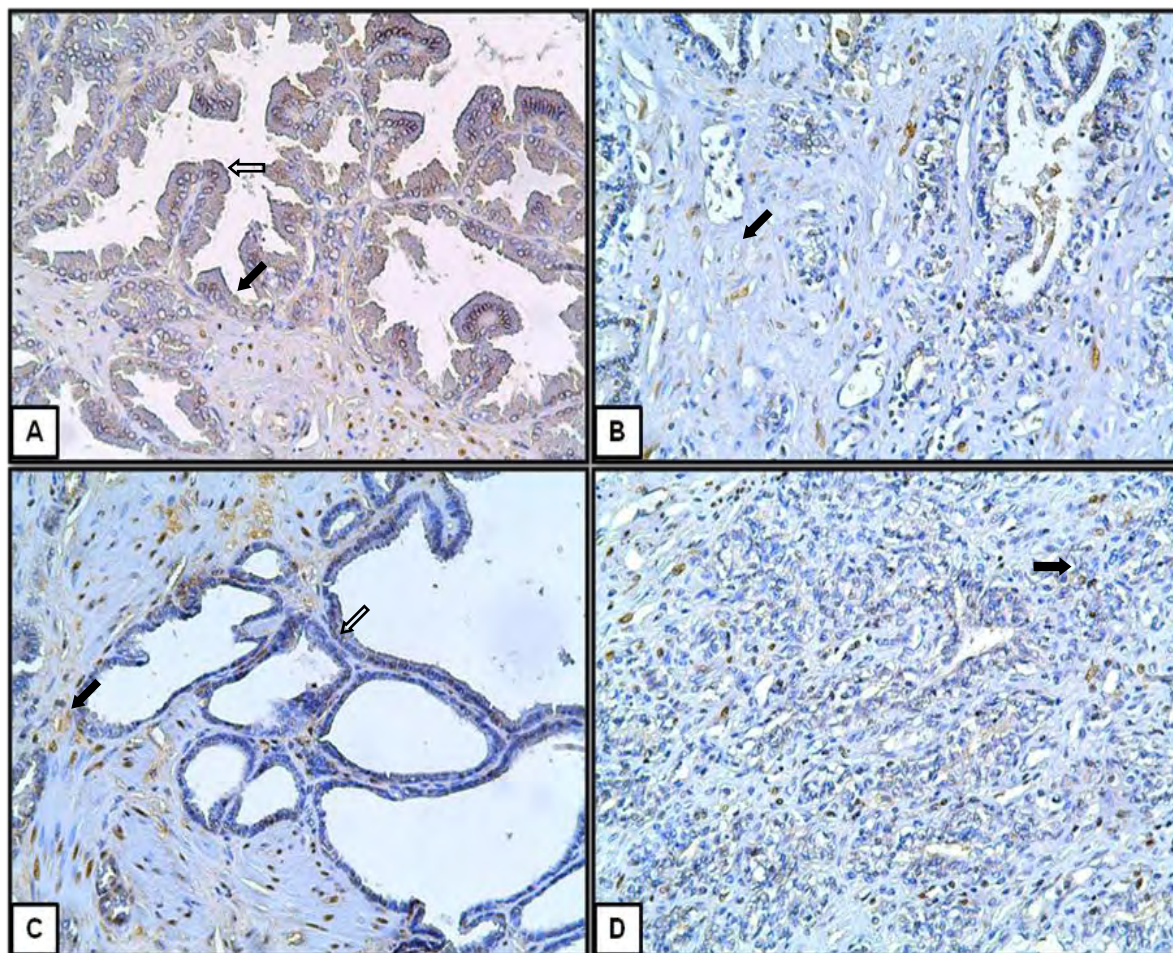


FIGURA 1 - Fotomicrografias da próstata canina. IHQ, anti-TIMP-1, objetiva 20x.

A) Próstata normal. Células epiteliais (seta vazada) a estromais (seta cheia) com escores de marcação um e dois, respectivamente. B) HPB estromal. Escores zero e dois para células epiteliais e estromais (seta), respectivamente. C) HPB epitelial. Células do estroma periacinar marcadas em escore três (seta cheia) e ausência de marcação nas células epiteliais (seta vazada). D) Carcinoma prostático. Marcação em escore três nas células estromais (seta) e ausência de marcação de células epiteliais neoplásicas.

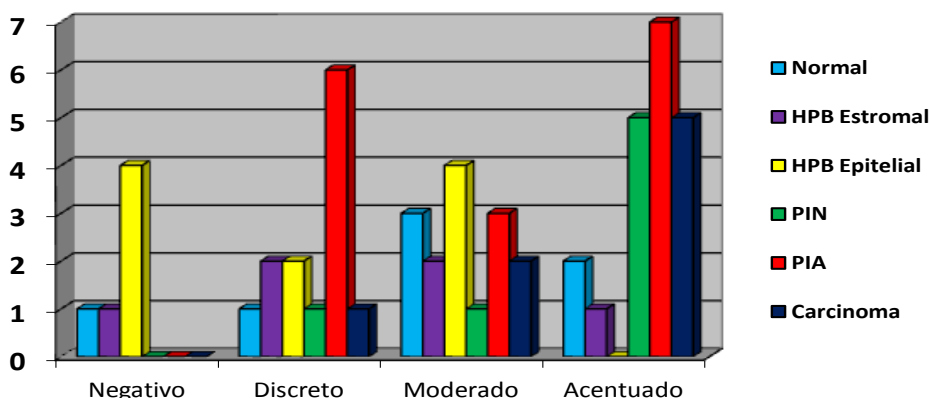


FIGURA 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de intensidade de marcação imunoistoquímica das células estromais periacinares por anti-TIMP-1 nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.

Na avaliação da expressão de TIMP-2 houve marcação citoplasmática das células epiteliais e estromais prostáticas, sendo que esta variou de negativa a acentuada a depender do tipo histológico (Figura 3).

Houve diferença na intensidade de marcação das células epiteliais acinares de próstatas normais e com lesões proliferativas. Entretanto, quando avaliada a intensidade de marcação das células estromais não houve diferença (Tabela 2).

Para a expressão de TIMP-2 no epitélio da próstata, comparando cada um dos diagnósticos foi verificada diferença estatística entre HPB epitelial e HPB estromal, com maior expressão de TIMP-2 nas HPB epiteliais. Também houve diferença entre carcinoma e tecido normal, HPB epitelial e PIN, com menor expressão nas células epiteliais dos carcinomas. Entre os tipos de PIA não foi observada diferença significativa, apenas PIA moderada apresentou diferença estatística com HPB epitelial, sendo a HPB mais marcada que a PIA.

TABELA 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação pelo anticorpo TIMP-2 nas células epiteliais acinares e estromais em relação ao diagnóstico.

| CÉLULAS EPITELIAIS (p=0,004) |          |       |          |       |          |       |           |       |
|------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| DIAGNÓSTICO                  | Negativo |       | Discreta |       | Moderada |       | Acentuada |       |
|                              | n        | %     | n        | %     | n        | %     | N         | %     |
| NORMAL <sup>A</sup>          | -        | 0,0   | 2        | 9,5   | 2        | 20,0  | 3         | 17,6  |
| HPB EPITELIAL <sup>B</sup>   | -        | 0,0   | 1        | 4,8   | 3        | 30,0  | 6         | 35,3  |
| HPB ESTROMAL <sup>C,B</sup>  | -        | 0,0   | 5        | 23,8  | -        | 0,0   | 1         | 5,9   |
| PIN <sup>D</sup>             | -        | 0,0   | 3        | 14,3  | 2        | 20,0  | 2         | 11,8  |
| CARCINOMA <sup>E,A,B,D</sup> | 4        | 66,7  | 4        | 19,0  | -        | 0,0   | -         | 0,0   |
| PIA DISCRETA <sup>F</sup>    | -        | 0,0   | 1        | 4,8   | 2        | 20,0  | 2         | 11,8  |
| PIA MODERADA <sup>G,B</sup>  | 1        | 16,7  | 3        | 14,3  | 1        | 10,0  | 1         | 5,9   |
| PIA ACENTUADA <sup>H</sup>   | 1        | 16,7  | 2        | 9,5   | -        | 0,0   | 2         | 11,8  |
| Total                        | 6        | 100,0 | 21       | 100,0 | 10       | 100,0 | 17        | 100,0 |

| CÉLULAS ESTROMAIS (p=0,063) |          |       |          |       |          |       |           |       |
|-----------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| DIAGNÓSTICO                 | Negativo |       | Discreta |       | Moderada |       | Acentuada |       |
|                             | n        | %     | n        | %     | n        | %     | n         | %     |
| NORMAL                      | 6        | 18,8  | 1        | 8,3   | -        | 0,0   | -         | 0,0   |
| HPB EPITELIAL               | 5        | 15,6  | 2        | 16,7  | 2        | 33,3  | 1         | 25,0  |
| HPB ESTROMAL                | 3        | 9,4   | 2        | 16,7  | -        | 0,0   | 1         | 25,0  |
| PIN                         | 5        | 15,6  | 1        | 8,3   | 1        | 16,7  | -         | 0,0   |
| CARCINOMA                   | 8        | 25,0  | -        | 0,0   | -        | 0,0   | -         | 0,0   |
| PIA DISCRETA                | 1        | 3,1   | 3        | 25,0  | 1        | 16,7  | -         | 0,0   |
| PIA MODERADA                | 3        | 9,4   | -        | 0,0   | 2        | 33,3  | 1         | 25,0  |
| PIA ACENTUADA               | 1        | 3,1   | 3        | 25,0  | -        | 0,0   | 1         | 25,0  |
| Total                       | 32       | 100,0 | 12       | 100,0 | 6        | 100,0 | 4         | 100,0 |

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os diagnósticos que tais letras representam.

A Figura 4 representa a intensidade de marcação pelo TIMP-2 nas células epiteliais acinares da próstata do cão. Todas as amostras prostáticas normais expressaram a proteína TIMP-2, da mesma forma como as amostras de HPB e PIN. As amostras de carcinoma não apresentaram marcação ou foram



discretamente marcadas. Os grupos de PIA expressaram TIMP-2 nas células epiteliais e nas células inflamatórias que margeavam as células displásicas.

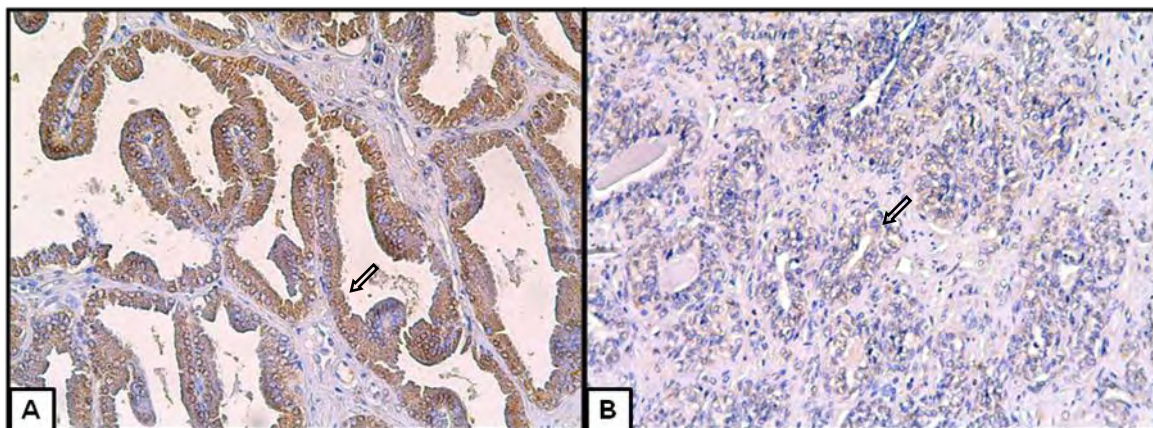


FIGURA 3 - Fotomicrografias da próstata canina. IHQ, anti-TIMP-2, objetiva 20x.

- A) Próstata normal. Células epiteliais com escore três para intensidade de marcação (seta) e células estromais não marcadas.
- B) Carcinoma prostático. Células epiteliais neoplásicas com escore um (seta) e estromais com escore zero para a intensidade de marcação.

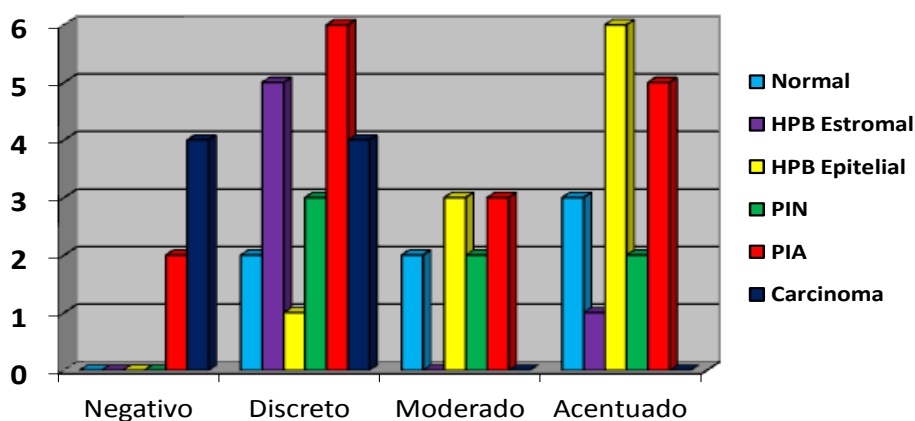


FIGURA 4 – Distribuição dos casos de acordo com os escores encontrados para a intensidade de marcação das células epiteliais acinares pelo TIMP-2 nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.



A Tabela 3 apresenta os resultados do teste de Correlação de Spearman, realizado para verificar a correlação entre a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 em cada diagnóstico, para cada tipo celular, epitélio e estroma periacinar.

TABELA 3 – Correlação entre TIMP-1 e TIMP-2 em próstatas normais e com lesões proliferativas de acordo com a intensidade de marcação do epitélio e do estroma glandular.

| Diagnóstico   | Epitélio     |       | Estroma      |       |
|---------------|--------------|-------|--------------|-------|
|               | r            | p     | r            | p     |
| NORMAL        | -0,297       | 0,518 | 0,432        | 0,333 |
| HPB EPITELIAL | 0,284        | 0,427 | -0,168       | 0,643 |
| HPB ESTROMAL  | -0,348       | 0,499 | 0,707        | 0,116 |
| PIN           | -0,522       | 0,230 | <b>0,825</b> | 0,022 |
| CARCINOMA     | -0,078       | 0,853 | 0,0          | 0,0   |
| PIA DISCRETA  | -0,803       | 0,102 | -0,471       | 0,423 |
| PIA MODERADA  | -0,033       | 0,950 | 0,721        | 0,106 |
| PIA ACENTUADA | <b>0,884</b> | 0,047 | 0,825        | 0,086 |

Correlação de Spearman.  $p < 0,05$ ;  $-1 \leq r \leq 1$ .

Para o epitélio foi verificado que há correlação de expressão entre TIMP-1 e TIMP-2 apenas na PIA acentuada. Tal correlação é forte e positiva, o que significa dizer que nestas amostras os dois anticorpos agem de maneira sinérgica, aumentam concomitantemente. Para as células estromais periacinares houve correlação entre TIMP-1 e TIMP-2 apenas na PIN, sendo esta correlação forte e positiva.

## DISCUSSÃO

A despeito da importância dos diferentes tipos de TIMP no desenvolvimento das lesões proliferativas, não há avaliação anterior desses inibidores na próstata canina normal e com lesões benignas, pré-malignas e malignas, como a realizada neste estudo, no qual se constatou a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 em todos os tipos histológicos mencionados. Além da

expressão de TIMP-1 e TIMP-2 constatada na próstata do cão, foi verificada variação na marcação observada entre os componentes epitelial e estromal e os diagnósticos. Diante disso, à semelhança do que ocorre para a espécie humana, é possível vislumbrar o emprego destes marcadores como fatores prognósticos e como ferramentas para compreensão do processo de progressão neoplásica.

No presente estudo foi verificada diferença na expressão de TIMP-2 entre células epiteliais neoplásicas e normais na próstata canina, sendo a expressão no tecido normal maior que no tecido neoplásico. Ao contrário, BAKER et al. (2006) utilizando amostras de carcinoma epidermoide oral de humanos constataram que MMP-1, MMP-3, MMP-2 e MMP-9 apresentam maior expressão nos tecidos neoplásicos que naqueles histologicamente normais, enquanto TIMP-1 e TIMP-2 não apresentam diferença considerável de expressão entre tecido neoplásico e normal. Considerando os achados de FALEIRO (2010), que observou aumento na expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido prostático canino neoplásico, é possível sugerir que a menor expressão de TIMP-2 neste mesmo cenário pode representar maior degradação de MEC e facilitação da invasão tumoral.

Nesta pesquisa foi observada maior expressão de TIMP-1 nas neoplasias prostáticas caninas que no tecido prostático normal, enquanto o TIMP-2 apresenta maior expressão nas células normais. No entanto, JOBIM et al. (2009) realizaram testes imunoistoquímicos para MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em 88 casos de neoplasias mamárias de mulheres e verificaram que todas estas proteínas encontravam-se superexpressas nas amostras estudadas. Assim, é pode-se inferir que para o cão o TIMP-1 apresente maior importância no processo de progressão neoplásica que TIMP-2.

No adenocarcinoma prostático canino foi constatada marcação imunoistoquímica para TIMP-1 em fibroblastos, células inflamatórias e demais células do estroma prostático. Da mesma forma, KUSKUNOVIC et al. (2009) também realizaram análise imunoistoquímica de glândulas mamárias humanas acometidas por diferentes tipos de neoplasias e encontraram expressão citoplasmática da proteína TIMP-1 em células epiteliais neoplásicas, fibroblastos e células inflamatórias localizadas no estroma glandular.

No cão foi verificado que o adenocarcinoma prostático expressa altos níveis de TIMP-1 e baixos níveis de TIMP-2, quando comparado com o tecido normal, o que chama atenção para as possíveis diferenças de comportamento biológico existentes entre as neoplasias prostáticas de humanos e cães. Contudo, considerando as informações de diferentes trabalhos científicos é possível constatar que a variação na expressão de TIMP-1 relaciona-se ao tipo tumoral em questão. No câncer colorretal humano, elevados níveis de TIMP-1 são descritos e correlacionados com ocorrência de metástase, já na neoplasia pancreática desta mesma espécie é relatada baixa expressão dessa proteína (BRAMHALL et al., 1996). Da mesma forma, WOOD et al. (1997) referem diminuição dos níveis de TIMP-1 e TIMP-2 no câncer prostático em humanos.

A respeito da expressão de TIMP-1 e TIMP-2 no tecido prostático normal a literatura apresenta dados divergentes. STILL et al. (2000) referem expressão de TIMP-2 apenas em células epiteliais, enquanto WOOD et al. (1997) encontrou TIMP-1 e TIMP-2 nas células estromais da glândula. Já ZHANG et al. (2002) realizaram cultivo de células prostáticas e constataram que ambas, epiteliais e estromais, são capazes de sintetizar e expressar TIMP-1 e TIMP-2. Neste estudo, foi observado que para o cão a expressão de TIMP-1 no tecido prostático normal ocorre principalmente nas células do estroma periacinar, enquanto o TIMP-2 é mais expresso pelas células epiteliais acinares.

Em cultura de células neoplásicas prostáticas de humanos e de células normais do estroma desta glândula DONG et al. (2001) compararam a expressão de MMP-9 com TIMP-1 e TIMP-2, e observaram que a expressão da MMP é elevada em relação a dos TIMP. Na glândula do cão acometida por adenocarcinoma houve considerável expressão de TIMP-1 pelas células estromais, já quanto ao TIMP-2 não houve expressão ou a marcação foi discreta nestas mesmas células.

BREHMER et al. (2003) pesquisaram a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em próstatas humanas acometidas por neoplasias e concluíram que tanto estroma quanto epitélio de amostras normais são fortemente marcados por TIMP-1, enquanto os mesmos componentes em amostras tumorais apresentam marcação discreta ou ausente. De outra parte, nas próstatas caninas deste estudo não foram verificados resultados significativos quanto a expressão

de TIMP-1 nas células epiteliais, já nas células estromais a referida proteína apresentou maior expressão no tecido prostático neoplásico em relação ao normal. As células epiteliais neoplásicas não apresentaram diferença de expressão de TIMP-2 em relação ao epitélio normal, assim como observado por BREHMER et al. (2003) que não constataram diferença significativa entre a marcação das células tumorais e do epitélio benigno em humanos.

ESCAFF et al. (2010) e ZHONG et al. (2008) estudaram lesões de próstatas humanas e constataram maior expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 nos carcinomas que nas amostras de PIN e HPB, o que segundo os autores demonstra o envolvimento destas proteínas na progressão tumoral. ESCAFF et al. (2010) chama atenção para a característica multifuncional do TIMP, e exemplifica com o TIMP-2, que ao mesmo tempo que inibe MMP-2, apresenta papel na ativação desta endopeptidase. À luz desse fato é possível destacar possíveis diferenças quanto a expressão dos TIMP entre homem e cão. Ao mesmo tempo, ressalta-se a importância do conhecimento da variação de expressão dessas proteínas nas diferentes lesões prostáticas.

Na avaliação da correlação de expressão entre os inibidores de metaloproteinases 1 e 2 no tecido prostático canino normal e com lesões benignas e malignas foi verificada correspondência entre essas enzimas no epitélio de próstatas com PIA acentuada, e no estroma de amostras de PIN, ou seja, em um microambiente displásico os inibidores de metaloproteinases 1 e 2 apresentam aumento de expressão concomitante e equivalente. BREHMER et al. (2003), afirmam que a atividade equilibrada das MMP e de seus inibidores é o principal fator responsável pelo controle da degradação da MEC, ao passo que o desequilíbrio na ação dessas enzimas contribui para a progressão tumoral. Assim, se considerado estudo realizado por FALEIRO (2010) em que foi verificada correlação de expressão de MMP-2 e MMP-9 em amostras prostáticas caninas de PIA, pode-se afirmar a importância do desequilíbrio da atividade destas enzimas para o desenvolvimento neoplásico. Contudo, isso é apenas uma possibilidade, já que neste estudo não foi avaliada a expressão das metaloproteinases.

## CONCLUSÕES

Há expressão de TIMP-1 e TIMP-2 na próstata canina, com variação na expressão de acordo com a lesão observada. Há maior expressão de TIMP-1 no tecido prostático com PIA, PIN e adenocarcinoma, enquanto TIMP-2 é menos expresso nestas lesões que no tecido normal ou com lesões benignas.

## REFERÊNCIAS

1. BAKER, E.A.; LEAPER, D.J.; HAYTER, J.P.; DICKENSON, A.J. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, London, v.44, p.482–486, 2006.
2. BILLIS, A.; MAGNA, L.A. Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance. **Archives of pathology & laboratory medicine**, Chicago, v. 127, n. 7, p. 840-844, 2003.
3. BÖHLE, A.S.; KALTHOFF, H. Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. **Langenbeck's archives of surgery**, Berlin, v. 384, n. 2, p. 133-140, 1999.
4. BORNSTEIN, P.; SAGE, H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.14, p.608-616, 2002.
5. BOSTWICK, D.G; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern Pathology**, Baltimore, v.17, n.3, p.360-379, 2004.
6. BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Seminars in Cancer Biology – Science Direct**, Bethesda, 2010, 8p.
7. BRAMHALL, S.R.; STAMP, G.W.; DUNN, J.; LEMOINE, N.R.; NEOPTOLEMOS, J.P. Expression of collagenase (MMP-2), stromelysin (MMP-3) and tissue inhibitor of the metalloproteinases (TIMP-1) in pancreatic and ampullary disease. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.73, p.972-978, 1996.

8. BREHMER, B.; BIESTERFELD, S.; JAKSE, G. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and their inhibitors (TIMP-1 and -2) in prostate cancer tissue. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, USA, v.6, p.217-222, 2003.
9. BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1477, p.267-283, 2000.
10. BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochemistry et Biophysics Acta**, Amsterdam, v.1803, p.55-71, 2010.
11. BUBENDORF, L.; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **Journal of Pathology**, Sussex, v.195, n. 1, p.72–79, 2001.
12. 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 pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, New York, v. 45, n. 1, p. 173-183, 2000.
13. DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; EPSTEIN, J. I.; ALI, T.; BILLIS, A.; CHAN, T. Y.; CHENG, L.; DATTA, M.; EGEVAD, L.; ERTÖY-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. **American Journal of Surgical Pathology**, New York, v.30, n.10, p.1281-1291, 2006.
14. DE MARZO, A.M.; COFFEY, D.S.; NELSON, W.G. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Urology**, Secaucus, v.53, suppl. 3A; p.29-40, 1999.
15. DONG, Z.; NEMETH, J.A.; CHER, M.L.; PALMER, K.C.; BRIGHT, R.C.; FRIDMAN, R. Differential regulation of matrix metalloproteinases-9, tissue

- inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. **International Journal of Cancer**, New York, v.93, p.507-515, 2001.
16. ESCAFF, S.; FERNANDEZ, J.M.; GONZALEZ, L.O.; SUAREZ, A.; GONZALEZ-REYES, S.; GONZALEZ, J.M.; VIZOSO, F.J. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in prostate cancer. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v.102, p. 922- 929, 2010.
  17. FALEIRO, M.B.R. **Expressão de MMP-2, MMP-9 e upar- em próstatas caninas normais e com HPB, PIA, PIN e carcinoma**. Goiânia, 2010, 97p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás.
  18. FONSECA ALVES, C.E.; FALEIRO, M.B.R.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Avaliação histopatológica da próstata canina de cães adultos sexualmente intactos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.3, p.596-602, 2010.
  19. JOBIM, F.C.; XAVIER, N.L.; UCHOA, D.M.; CRUZ, D.B.; SACILOTO, M.; CHEMELLO, N.; SCHWARTSMANN, G. Prevalence of vascular-endothelial growth factor, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in primary breast cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.42, p. 979-987, 2009.
  20. JOHNSEN, M.; LUND, R.L.; ROMER, J.; ALMHOLT, K.; DANO, K. Cancer invasion and tissue remodeling: common Themes in proteolytic matrix degradation. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.10, p.667-671, 1998.
  21. KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. **Nature Medicine**, New York, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.
  22. KUSKUNOVIC, S.; RADOVIC, S.; DORIC, M.; HIRIC, A.; BABIC, M.; TOMIC, I.; SELAK, I. Immunohistochemical expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in invasive breast carcinoma. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, Sarajevo, v.9, p.125-130, 2009.

23. MACLACHAN, N.J.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: Meuten, D.J. (Ed.), Tumors in Domestic Animals. Iowa State University Press, Ames, IA, 2002, p. 568– 570.
24. PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews/Molecular Cell Biology**, London, v.8, n.3, p.221-233, 2007.
25. PARKS, W.C.; WILSON, C.L.; LOPEZ-BOADO, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature. Review. Immunology.**, London, v.4, n.8, p.617-629, 2004.
26. RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; DE MOURA, V.M.B.D.; LAUFER-AMORIM, R. COX-2 and TGF- $\beta$  expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.3, p. 31-36, 2010.
27. STEARNS, M.E.; WANG, M. Type IV collagenase (Mr 72,000) expression in human prostate: benign and malignant tissue. **Cancer Research**, Baltimore; v. 53, n. 4, p. 878-883, 1996.
28. STILL, K.; ROBSON, C.N.; AUTZEN, P.; ROBINSON, M.C.; HAMDY, F.C. Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue. **The Prostate**, v.42, p. 18-25, 2000.
29. SUGAR, L.M. Inflammation and prostate cancer. **The Canadian Journal of Urology, (CJU)**, St. Laurent, Quebec, v.13, n.1, suplemento 1, p.46-47, 2006.
30. 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Ireland, v. 197, n.1, p. 251-255, 2002.
31. TOLEDO, D.C.; FALEIRO, M.B.R.; RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1372-1377, 2010.
32. VISSE, R. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v.92, n.8, p.827–829, 2003.



- 33.WOESSNER, J.F.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. **Oxford University Press**, New York, P.130-135, 2000.
- 34.WOOD, M.; FUDGE, K.; FROST, A.R.; GARCIA, F.; WANG, M.; STEARNS, M.E. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, Oxford, v.15, p. 246-258, 1997.
- 35.ZHANG, J.; JUNG, K.; LEIN, M.; KRISTIANSEN, G.; RUDOLPH, B.; HAUPTMANN, S.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A.; LICHTINGHAGEN, R. Diferential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human primary cultured prostatic cells and malignant prostate cell lines. **The Prostate**, New York, v.50, p. 38-45, 2002.
- 36.ZHONG, W.D.; HAN, Z.D.; HE, H.C.; BI, X.C.; DAI, Q.S.; ZHU, G.; YE, Y.K.; LIANG, Y.X.; QIN, W.J.; ZHANG, Z.; ZENG, G.H.; CHEN, Z.N. CD147, MMP-1, MMP-2 and MMP-9 protein expression as significant prognostic factors in human prostate cancer. **Oncology**, Basel, v.75, p. 230–236, 2008.

### **CAPÍTULO 3 – EXPRESSÃO DE TGF- $\beta$ EM PRÓSTATAS CANINAS NORMAIS E COM LESÕES PROLIFERATIVAS**

#### **RESUMO**

As lesões prostáticas em cães vêm sendo cada vez mais estudadas, devido as suas similaridades com as lesões encontradas na glândula humana. As principais são hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatites, cistos e o adenocarcinoma. Recentemente tem se dado atenção às lesões pré-neoplásicas, dentre elas a neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) e a atrofia inflamatória proliferativa (PIA). Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento do câncer prostático a partir de lesões pré-neoplásicas, alguns marcadores imunoistoquímicos são utilizados. O fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) induz a angiogênese e inibe a proliferação celular, sendo considerado um mediador do crescimento prostático. No presente trabalho, este marcador foi utilizado com o objetivo de se avaliar de maneira comparativa sua expressão nas lesões proliferativas benignas, pré-neoplásicas e neoplásicas da próstata do cão. Foram colhidas 150 próstatas de cães adultos e idosos em exames necroscópicos, e selecionadas 54 glândulas com histomorfologia normal, HPB epitelial, HPB estromal, PIA, PIN e adenocarcinoma, utilizadas para a confecção de um bloco de microarranjo tecidual (*Tissue Microarray* - TMA). As lâminas de TMA foram submetidas à técnica de imunoistoquímica com os anticorpos anti-TIMP-1 e anti-TIMP-2, sendo avaliada a intensidade de marcação nas células epiteliais e estromais. Houve expressão de TGF- $\beta$  tanto pelo tecido normal como por aquele com lesões proliferativas. Maior expressão foi encontrada nas células epiteliais do tecido normal e com HPB, enquanto as células estromais expressaram mais TGF- $\beta$  nas amostras de PIA, PIN e carcinoma. Tais resultados permitem sugerir a ação do TGF- $\beta$  tanto na manutenção da homeostase tecidual quanto na progressão para neoplasia prostática.

**Palavras-chave:** cão, carcinoma, fator de crescimento, HPB, imunoistoquímica, PIA, PIN.

### **CHAPTER 3 - EXPRESSION OF TGF- $\beta$ IN NORMAL CANINE PROSTATES AND WITH PROLIFERATIVE LESIONS**

#### **ABSTRACT**

Prostatic lesions in dogs are being increasingly studied, because of similarities with the lesions seen in the human prostate. The main prostatic diseases are benign prostatic hyperplasia (BPH), prostatic inflammation, cysts and adenocarcinoma. Pre-neoplastic lesions such as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and prostatic inflammatory atrophy (PIA) are being studied. Immunohistochemistry markers are used to evaluate prostatic cancer development from pre-neoplastic lesions. TGF- $\beta$  induces angiogenesis and inhibits cellular proliferation, it is considered a prostatic growth mediator. In this study, this marker was used to verify its role in benign lesions, pre-neoplastic lesions and prostatic cancer. A total of 150 prostates of adult dogs were obtained in postmortem examinations. From these, 54 glands with normal histomorphology, epithelial BPH, stromal BPH, PIA, PIN and adenocarcinoma were selected. The tissue microarray (TMA) slides were subjected to immunohistochemistry with anti-TIMP-1 and anti-TIMP-2. The staining intensity of TGF- $\beta$  in epithelial and stromal cells was evaluated. There was TGF- $\beta$  expression by both normal tissues and those with proliferative lesions. Increased expression was found in epithelial cells of normal tissue and BPH while stromal cells expressed more TGF- $\beta$  than PIA, PIN and carcinoma. These results suggest the role of TGF- $\beta$  in the maintenance of tissue homeostasis and in the progression of prostate neoplasia.

**Keywords:** BPH, carcinoma, dog, immunohistochemistry, growth factor, PIA, PIN.

## INTRODUÇÃO

À semelhança do que ocorre na espécie humana as doenças prostáticas têm sido frequentemente observadas na próstata canina e são comuns em cães não castrados adultos e idosos (FONSECA ALVES et al., 2010).

As lesões proliferativas verificadas na próstata do cão são a hiperplasia prostática benigna (HPB), a atrofia inflamatória proliferativa (PIA), a neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e o adenocarcinoma (FONSECA ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010; TOLEDO et al., 2010).

A HPB é considerada a principal afecção prostática em cães adultos não castrados (FONSECA ALVES et al., 2010). A PIA é considerada lesão pré-maligna devido a similaridades morfológicas com o carcinoma prostático e por envolver fatores potencialmente carcinogênicos como a inflamação (DE MARZO et al., 2006). A PIN consiste em lesão displásica do epitélio secretor, apresentando atipias celulares semelhantes às observadas nos adenocarcinoma (BOSTWICK & QUIAN, 2004).

Carcinomas prostáticos ocorrem comumente no homem e podem se desenvolver espontaneamente também no cão (CORNELL et al., 2000; MACLACHAN & KENNEDY, 2002). As neoplasias prostáticas nos cães geralmente são epiteliais malignas e, muitas vezes, apresentam estrutura glandular ou acinar, sendo classificadas como adenocarcinomas (CORNELL et al., 2000).

O fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) está envolvido em vários aspectos da carcinogênese. No início do desenvolvimento neoplásico esta citocina inibe a proliferação celular, mas com a progressão da neoplasia passa a aumentar a motilidade das células neoplásicas, predispondo a ocorrência de metástases (DERYNCK et al., 2001; DANIELPOUR, 2005). Em baixas concentrações o TGF- $\beta$  promove proliferação das células estromais prostáticas, enquanto em altas concentrações a citocina inibe tal proliferação. Por esse motivo acredita-se que o TGF seja um mediador do crescimento prostático (ZHOU et al., 2003).

RODRIGUES et al. (2010) realizaram imunoistoquímica com TGF- $\beta$  em lesões proliferativas da próstata do cão e verificaram grande expressão desta

citocina nas amostras neoplásicas. Observaram ainda que nas hiperplasias estromais a expressão de TGF- $\beta$  é maior do que nas epiteliais. De acordo com NIU et al. (2001) o TGF- $\beta$  acumula-se nas células estromais, fator que contribui para a proliferação celular e progressão das lesões proliferativas que ocorrem na próstata.

Este estudo teve por objetivo avaliar e comparar a expressão de TGF- $\beta$  em próstatas caninas normais e com HPB, PIN, PIA e carcinoma.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material e avaliação histomorfológica**

Foram colhidas 150 próstatas de cães adultos, não castrados, com ou sem histórico clínico de doença prostática e provenientes da rotina necroscópica do Setor de Patologia Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO e do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

Após a colheita, as glândulas foram identificadas e inicialmente seccionadas em um corte transversal na porção média, para melhor penetração do fixador. Quando muito grandes, eram realizados dois cortes obtendo-se três porções, cranial (PCr), média (PM) e caudal (PCa).

As glândulas foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 48 horas, recortadas, acondicionadas em cassetes e mantidas em álcool 70° até o processamento e inclusão em parafina. Após a inclusão foram confeccionados cortes de 3 $\mu$ m, estes distendidos em lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação histomorfológica.

Na avaliação histomorfológica foram selecionadas amostras de próstatas normais (n=7) e com lesões proliferativas, estas de acordo com critérios de FONSECA ALVES et al. (2010) para HPB (epitelial n=10 e estromal n=6), TOLEDO et al. (2010) para PIA (discreta n=5, moderada n=6 e acentuada n=5), BOSTWICK & QIAN (2004) para PIN (n=7) e SUGAR (2006) para carcinoma

(n=8), totalizando 54 próstatas. A análise foi realizada em microscópio óptico, inicialmente em menor aumento (32x), seguindo aos aumentos de 100x, 250x e 400x.

### **Microarranjo tecidual (*Tissue Microarray* – TMA)**

As amostras provenientes das 54 próstatas foram utilizadas para a confecção do bloco de microarranjo tecidual (TMA) e posterior realização da técnica de imunoistoquímica. As amostras foram devidamente marcadas nas lâminas de referência (HE) e identificadas nos blocos doadores, dos quais foram retirados cilindros (cores) de 1mm de diâmetro (*Tissue MicroArray builder* 20010.2, Histopathology Ltd, Hungary) correspondentes às áreas marcadas, e transferidos para o bloco receptor (TMA), conforme descrito por KONONEN et al. (1998) e BUBENDORF et al. (2001). Neste bloco também foi incluída uma amostra de placenta humana normal para a orientação da leitura das amostras nas lâminas de TMA.

Do bloco de TMA foram obtidos cortes de 3µm, estes distendidos sobre lâminas silanizadas (Starfrost White, Sakura, ready to use, Germany – Dako 9545-1) e submetidos à coloração de HE para a confirmação da presença das lesões selecionadas na avaliação histomorfológica, e à técnica de imunoistoquímica para a avaliação da expressão de TGF-  $\beta$ .

### **Imunoistoquímica**

Uma lâmina de TMA foi desparafinizada e diafanizada em três imersões sequenciais de xilol, por 30 minutos cada, a temperatura ambiente. Em seguida, foi submetida a passagens sequenciais em álcool (100°x3, 95°x1, 85°x1 e 70°x1), durante cinco minutos cada. Na próxima etapa, com o intuito de reduzir coloração de fundo, a lâmina foi incubada por cinco minutos em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) e lavada em água destilada.

Para a recuperação antigênica a lâmina foi submersa em solução tampão EDTA pH8.0, a 96°C, durante 25 minutos, em banho-maria. Após o arrefecimento foi lavada em água destilada e submetida ao bloqueio da peroxidase endógena por imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 10% (10ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/90ml de metanol), por 10 minutos. Seguiram-se o bloqueio de marcações inespecíficas em BSA a 1%, por uma hora, e solução de leite em pó desnatado a 10% (Molico® -10g/100 ml H<sub>2</sub>O destilada), durante uma hora e trinta minutos, e a incubação com o anticorpo primário diluído (*Antibody diluent*, ADS-125, Spring) a 1:50 (anti-TGF- $\beta$ , Novocastra 17), em câmara úmida, por 18 horas (*overnight*), a temperatura de 4°C. Como controle negativo foi utilizada uma lâmina em que o anticorpo primário foi substituído por solução tampão TRIS pH7.4.

As etapas seguintes consistiram da incubação com anticorpo secundário (Advance System, Dako K4068), em câmara úmida, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, e da revelação da reação em solução de diaminobenzidina (DAB, Dako K3468-1), por três minutos. Entre todas as etapas as lâminas foram lavadas em solução tampão TRIS pH7,4.

Seguiram-se a contracoloração em hematoxilina de Harris durante 20 segundos, a lavagem em água destilada, a desidratação em banhos sequenciais de álcool (85°x1, 95°x1 e 100°x3), por cinco minutos cada, banhos sequenciais de xilol, durante cinco minutos cada, e a montagem das lâminas com lamínulas e resina sintética, para posterior análise em microscópio óptico.

### **Análise estatística**

A avaliação dos resultados foi realizada de forma semi-quantitativa por meio de escores. Foi avaliada a intensidade de marcação das células epiteliais e estromais periacinares, utilizando o escore zero para ausência de marcação, um, dois e três para as marcações discreta, moderada e acentuada, respectivamente. As amostras foram analisadas por um avaliador, sendo realizada observação prévia de cada fragmento seguida por duas observações em que os escores de

classificação foram estabelecidos para cada um dos fragmentos amostrados (Quadro 1).

A análise dos dados obtidos no estudo imunoistoquímico foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis para a variável intensidade de marcação do anticorpo entre os diagnósticos. Os dados foram processados nos programas Excel 2010 e SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 16.0, sendo considerado efeito significativo quando  $p < 0.05$ .

QUADRO 1 – Escores utilizados para classificação da intensidade de marcação de células epiteliais e estromais da próstata canina.

| <b>Escore</b> | <b>Critérios</b>                                                                                    |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Zero</b>   | Ausência de marcação                                                                                |
| <b>Um</b>     | Marcação discreta no citoplasma celular, leve coloração acastanhada no citoplasma das células       |
| <b>Dois</b>   | Marcação moderada no citoplasma celular, coloração marrom clara observada no citoplasma das células |
| <b>Três</b>   | Marcação acentuada no citoplasma celular, coloração marrom intensa no citoplasma das células        |

## RESULTADOS

Empregando-se a técnica de imunoistoquímica nas amostras de próstata canina normal e com lesões proliferativas foi obtida marcação para TGF- $\beta$ , que apresentou sua expressão variando do escore zero ao três para a intensidade de marcação das células a depender do tipo celular (epitelial ou estromal) e do diagnóstico (Figura 1).

Houve diferença significativa entre os diagnósticos quando considerada a intensidade de marcação das células epiteliais para TGF- $\beta$ . Entretanto, quando considerados os tipos de PIA não houve diferença. Quando considerada a intensidade de marcação das células estromais periacinares para TGF- $\beta$  também foi constatada diferença significativa (Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ) (Tabela 1).



Nas células epiteliais prostáticas observadas, o TGF- $\beta$  apresentou marcação citoplasmática. As amostras de PIA, PIN e carcinoma foram as que mais apresentaram escore zero. O tecido prostático normal e com HPB apresentou marcação para TGF- $\beta$  com os escores variando entre um e três para normal e HPB epitelial e um e dois para HPB estromal (Figura 2).

No epitélio acinar foi verificada diferença estatística na expressão de TGF- $\beta$  entre HPB estromal, tecido normal e HPB epitelial, com marcação mais acentuada nos dois últimos tipos. Observou-se também diferença entre a marcação das amostras de PIN e carcinoma, em comparação com as normais e com HPB epitelial, sendo mais expresso nessas que naquelas. Na PIA moderada o TGF- $\beta$  foi menos expresso que na HPB epitelial (Tabela 1).

TABELA 1 – Distribuição dos casos de acordo com os escores aplicados à variável intensidade de marcação do anticorpo TGF- $\beta$  nas células epiteliais acinares e estromais periacinares em relação ao diagnóstico.

| Células epiteliais (p=0,006)  |          |       |          |       |          |       |           |       |
|-------------------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|-----------|-------|
| DIAGNÓSTICO                   | Negativo |       | Discreta |       | Moderada |       | Acentuada |       |
|                               | n        | %     | n        | %     | n        | %     | n         | %     |
| NORMAL <sup>A</sup>           | -        | 0,0   | 2        | 10,5  | 3        | 21,4  | 2         | 22,2  |
| HPB EPITELIAL <sup>B</sup>    | -        | 0,0   | 2        | 10,5  | 4        | 28,6  | 4         | 44,4  |
| HPB ESTROMAL <sup>C,A,B</sup> | -        | 0,0   | 5        | 26,3  | 1        | 7,1   | -         | 0,0   |
| PIN <sup>D,A,B</sup>          | 2        | 16,7  | 4        | 21,1  | 1        | 7,1   | -         | 0,0   |
| CARCINOMA <sup>E,A,B</sup>    | 4        | 33,3  | 3        | 15,8  | 1        | 7,1   | -         | 0,0   |
| PIA DISCRETA <sup>F</sup>     | 1        | 8,3   | 2        | 10,5  | 2        | 14,3  | -         | 0,0   |
| PIA MODERADA <sup>G,B</sup>   | 3        | 25,0  | 1        | 5,3   | 1        | 7,1   | -         | 0,0   |
| PIA ACENTUADA <sup>H</sup>    | 2        | 16,7  | -        | 0,0   | 1        | 7,1   | 3         | 33,3  |
| TOTAL                         | 12       | 100,0 | 19       | 100,0 | 14       | 100,0 | 9         | 100,0 |

| Células estromais (p=0,035) |          |      |          |      |          |      |           |     |
|-----------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|-----------|-----|
| DIAGNÓSTICO                 | Negativo |      | Discreta |      | Moderada |      | Acentuada |     |
|                             | n        | %    | n        | %    | n        | %    | n         | %   |
| NORMAL <sup>A</sup>         | 4        | 19,0 | 1        | 7,1  | 2        | 12,5 | -         | 0,0 |
| HPB EPITELIAL <sup>B</sup>  | 4        | 19,0 | 4        | 28,6 | 2        | 12,5 | -         | 0,0 |
| HPB ESTROMAL <sup>C</sup>   | 1        | 4,8  | 4        | 28,6 | 1        | 6,3  | -         | 0,0 |
| PIN <sup>D</sup>            | 3        | 14,3 | 3        | 21,4 | 1        | 6,3  | -         | 0,0 |
| CARCINOMA <sup>E</sup>      | 6        | 28,6 | 1        | 7,1  | 1        | 6,3  | -         | 0,0 |

|                                   |           |              |           |              |           |              |          |              |
|-----------------------------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|----------|--------------|
| PIA DISCRETA <sup>F</sup>         | 2         | 9,5          | -         | 0,0          | 2         | 12,5         | 1        | 33,3         |
| PIA MODERADA <sup>G,B,C,D,E</sup> | -         | 0,0          | 1         | 7,1          | 4         | 25,0         | 1        | 33,3         |
| PIA ACENTUADA <sup>H,E</sup>      | 1         | 4,8          | -         | 0,0          | 3         | 18,8         | 1        | 33,3         |
| <b>TOTAL</b>                      | <b>21</b> | <b>100,0</b> | <b>14</b> | <b>100,0</b> | <b>16</b> | <b>100,0</b> | <b>3</b> | <b>100,0</b> |

Teste: Kruskal Wallis. No campo diagnóstico, mais de uma letra indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os diagnósticos que tais letras representam.

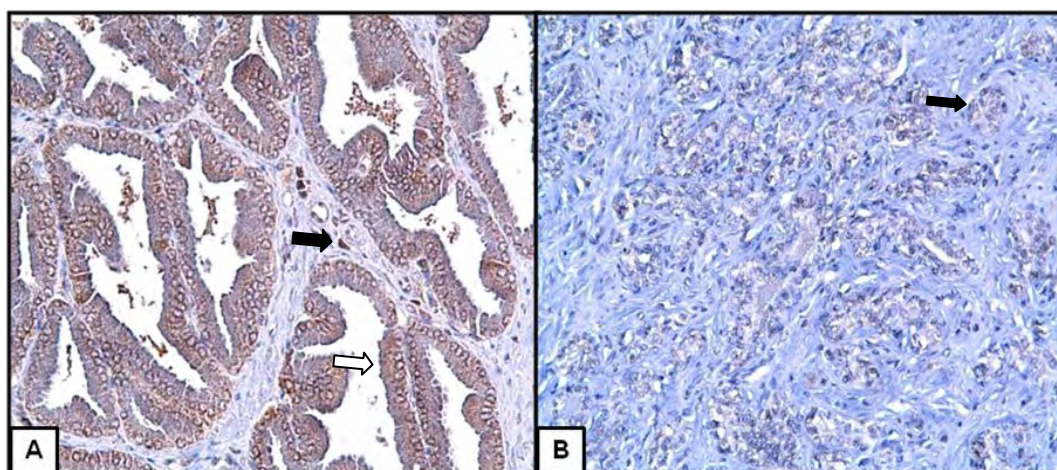


FIGURA 1 - Fotomicrografias da próstata canina. IHQ, anti-TGF-  $\beta$ , objetiva 20x. A) Próstata normal. Células epiteliais (seta vazada) e estromais (seta cheia) com escore dois para intensidade de marcação. B) Carcinoma prostático. Células epiteliais com escore um (seta) e estromais com escore zero para a intensidade de marcação.

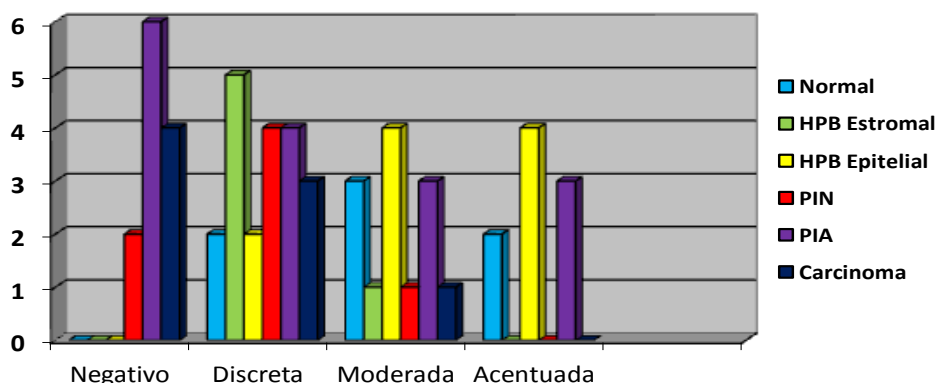


Figura 2 – Distribuição dos casos de acordo com os escores para a intensidade de marcação das células epiteliais acinares pelo TGF- $\beta$  nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.

Na comparação realizada entre cada um dos diagnósticos verificou-se que houve diferença estatística na expressão de TGF- $\beta$  nas células estromais com maior expressão na PIA moderada que em HPB epitelial, HPB estromal, PIN e carcinoma. Também houve diferença significativa entre a expressão de PIA acentuada e carcinoma, com menor expressão no carcinoma. Nas células estromais da próstata do cão foi observada diferença estatística na expressão celular do anticorpo anti-TGF- $\beta$  entre os diagnósticos selecionados. Da mesma forma como observado para as células epiteliais, não foi observada diferença significativa entre os tipos de PIA (Tabela 1).

As células estromais periacinares quando marcadas pelo TGF- $\beta$ , apresentaram marcação citoplasmática, principalmente de fibroblastos. Houve maior frequência do escore zero, que significa a ausência de marcação. Apenas nos grupos de PIA foi verificado escore três, sendo observada marcação citoplasmática nas células do infiltrado inflamatório (Figura 3).

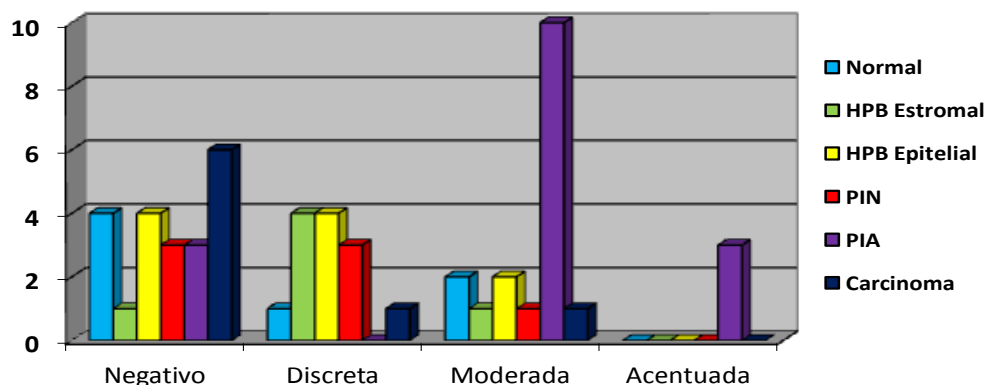


Figura 3 – Distribuição dos casos de acordo com os escores encontrados para a intensidade de marcação imunoistoquímica das células estromais periacinares pelo TGF- $\beta$  nos diferentes padrões histomorfológicos analisados na próstata do cão.

## DISCUSSÃO

Nas próstatas caninas avaliadas, foi observada expressão de TGF- $\beta$  em células estromais periacinares das amostras normais e nas lesões de HPB, PIN, PIA e carcinoma. O que corrobora o descrito por NIU et al. (2001) que afirma que o TGF- $\beta$  é produzido pelas células estromais prostáticas e apresenta como funções o suprimento da proliferação tecidual, diferenciação, estímulo a apoptose e indução a angiogênese, apresentando, portanto, papel importante tanto na manutenção da homeostase tecidual como na progressão de lesões pré-neoplásicas em neoplásicas (NIU et al. 2001).

Nas amostras de neoplasia intraepitelial prostática do cão foi verificada discreta a moderada marcação para TGF- $\beta$  tanto em células estromais quanto nas epiteliais. Ao contrário disso, ao estudar a PIN de alto grau na próstata de ratos WONG et al. (2000) constataram marcação imunoistoquímica para TGF- $\beta$

nas células estromais adjacentes as células epiteliais displásicas, enquanto no epitélio acinar não foi visualizada expressão da citocina. Com esse resultados os autores sugeriram o papel do TGF- $\beta$  no estímulo da proliferação celular e no desenvolvimento neoplásico.

Segundo RODRIGUES et al. (2010), a hiperplasia prostática benigna do tipo estromal apresenta maior intensidade de marcação para TGF- $\beta$  que as demais lesões proliferativas da próstata do cão, e justificam que esta diferença ocorre devido ao processo inflamatório que geralmente encontra-se associado a este tipo de HPB. Contudo, neste trabalho não foi verificada tal relação. Os resultados deste estudo demonstram maior expressão de TGF- $\beta$  nas células epiteliais que nas estromais, sendo maior a quantidade de escore zero neste último tipo celular. Apesar disso, para NIU et al. (2001), o TGF- $\beta$  possui a capacidade de se acumular nas células do estroma prostático e, por esse motivo, contribui para o desenvolvimento de hiperplasia prostática.

Para as próstatas caninas amostradas, verificou-se que as células epiteliais as células epiteliais apresentaram-se mais intensamente marcadas para TGF- $\beta$  que as estromais, tanto no tecido normal como no neoplásico. Da mesma forma como observado por PERRY et al. (1997), que realizaram estudo utilizando TGF- $\beta$  em próstatas humanas neoplásicas em comparação com glândulas normais.

Neste estudo as amostras de carcinoma prostático apresentaram menor expressão de TGF- $\beta$  em comparação ao tecido normal, tanto nas células epiteliais quanto nas estromais peritumorais. Entretanto, WOLFF et al. (1998) realizaram estudo imunoistoquímico em neoplasias prostáticas humanas e observaram acentuada marcação para TGF- $\beta$  no tecido neoplásico quando comparado ao tecido prostático normal, assim como observado por RODRIGUES et al. (2010) em próstatas caninas, o que possibilitou que os autores sugerissem que as células epiteliais neoplásicas produzem e secretam esta citocina.

No presente estudo, houve maior expressão de TGF- $\beta$  nas lesões benignas e no tecido normal, enquanto nas lesões pré-malignas e malignas a expressão desta citocina foi reduzida, o que corrobora o descrito por LEE et al. (1999). Para estes autores, o modo de ação do TGF- $\beta$  no tecido prostático é variável. Na hiperplasia prostática benigna age mantendo a homeostase epitelial.

Já no câncer prostático, além de se apresentar em quantidade reduzida, as células neoplásicas não são afetadas pela citocina, o que aumenta a possibilidade de desenvolvimento neoplásico.

## CONCLUSÕES

Há variação na expressão do TGF- $\beta$  na próstata canina de acordo com a lesão, sendo observada maior expressão no tecido normal e com HPB, quando comparados aos focos de PIA, PIN e carcinoma.

## REFERÊNCIAS

1. BOSTWICK, D.G; QIAN, J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Modern Pathology**, Baltimore, v.17, n.3, p.360-379, 2004.
2. BUBENDORF, L; NOCITO, A.; MOCH, H.; SAUTER, G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **Journal of Pathology**, Sussex, v.195, n. 1, p.72–79, 2001.
3. 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 pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. **The Prostate**, New York, v. 45, n. 1, p. 173-183, 2000.
4. DANIELPOUR, D: Functions and regulation of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) in the prostate. **European Journal of Cancer**, New York, v. 41, p. 846-857, 2005.
5. DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; EPSTEIN, J. I.; ALI, T.; BILLIS, A.; CHAN, T. Y.; CHENG, L.; DATTA, M.; EGEVAD, L.; ERTÖY-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. **American Journal of Surgical Pathology**, New York, v.30, n.10, p.1281-1291, 2006.
6. DERYNCK R, AKHURST RJ, BALMAIN A: TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature Genetics**, New York, v.29, p.117-129, 2001.
  7. FONSECA ALVES, C.E.; FALEIRO, M.B.R.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Avaliação histopatológica da próstata canina de cães adultos sexualmente intactos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, n.3, p.596-602, 2010.
  8. KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIMENI, O.P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. *Nature Medicine*, New York, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.
  9. LEE, C.; SINTICH, S.M.; MATHEWS, E.P.; SHAH, A.H.; KUNDU, S.D.; PERRY, K.T.; CHO, J.S.; ILIO, K.Y.; CRONAUER, M.V.; JANULIS, L.; SENSIBAR, J. Transforming growth factor- $\beta$  in benign and malignant prostate. **The Prostate**, New York, v.39, p.285-290, 1999.
  10. MACLACHAN, N.J.; KENNEDY, P.C. Tumors of the genital systems. In: Meuten, D.J. (Ed.), **Tumors in Domestic Animals**. Iowa State University Press, Ames, IA, 2002, p. 568–570.
  11. NIU, Y.; XU, Y.; ZHANG, J.; BAI, J.; YANG, H.; MA, T. Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells. **British Journal of Urology**, Oxford, v.87, p.386-393, 2001.
  12. PERRY, K.T.; ANTHONY, C.T.; STEINER, M.S. Immunohistochemical localization of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3 in normal and malignant human prostate. **The Prostate**, New York, v.33, p.133-140, 1997.
  13. RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; DE MOURA, V.M.B.D.; LAUFER-AMORIM, R. COX-2 and TGF- $\beta$  expression in proliferative disorders of canine prostate. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, São Paulo, v.3, p. 31-36, 2010.

14. SUGAR, L.M. Inflammation and prostate cancer. **The Canadian Journal of Urology, (CJU)**, St. Laurent, Quebec, v.13, n.1, suplemento 1, p.46-47, 2006.
15. TOLEDO, D.C.; FALEIRO, M.B.R.; RODRIGUES, M.M.P.; DI SANTIS, G.W.; LAUFER-AMORIM, R.; DE MOURA, V.M.B.D. Caracterização histomorfológica da atrofia inflamatória proliferativa na próstata canina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.6, p.1372-1377, 2010.
16. WOLFF, J.M. et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 serum concentration in patients with prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia. **British Journal of Urology**, v.81, p. 403-405, 1998.
17. WONG, Y.C.; XIE, W; TSAO, S.W. Structural changes and alteration in expression of TGF- $\beta$ 1 and its receptors in prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in the ventral prostate of noble rats. **The Prostate**, New York, v.45, p.289-298, 2000.
18. ZHOU, W.; PARK, I.; PINS, M.; KOZLOWSKI, J.M.; JOVANOVIC, B.; ZHANG, J.; LEE, C.; ILIO, K. Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor- $\beta$ 1. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, p.4280-4284, 2003.



## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho foi possível observar que existem diferenças na expressão dos marcadores teciduais entre a espécie humana e a canina. No cão, observou-se a expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TGF- $\beta$  nas diferentes lesões proliferativas da próstata. Maior expressão de TIMP-1 ocorreu nas lesões pré-malignas e malignas, ao contrário do verificado para o TIMP-2, que apresentou-se mais intensamente expresso no tecido normal e lesões benignas. Da mesma forma, o TGF- $\beta$  também foi mais expresso nas próstatas normais e com HPB epitelial e estromal.

Quanto ao TIMP-1, sua maior expressão no tecido displásico leva a crer que o desbalanço na relação TIMP-1/MMP-9 corrobore para a progressão neoplásica. Já a menor expressão de TIMP-2 nas lesões pré-malignas e no carcinoma, pode representar menor inibição de MMP-2, com consequente desenvolvimento das lesões, ou ainda, menor ativação de MMP-2 na tentativa de impedir a evolução das lesões.

A maior expressão de TGF- $\beta$  no tecido normal e com HPB, sugere maior envolvimento deste na manutenção da homeostase. Sua menor expressão nos tecidos pré-neoplásicos e neoplásicos, pode se relacionar a menor regulação da proliferação celular, sendo este fator favorável a progressão neoplásica.

O uso da técnica de microarranjo tecidual conferiu grande economia de reagentes e tempo, proporcionando a uniformização na realização das reações e na interpretação dos resultados, além de levar a simplificação do trabalho.

Ainda, com estudo da expressão de TIMP-1, TIMP-2 e TGF- $\beta$  em próstatas caninas normais e com HPB, PIN, PIA e carcinoma conclui-se que há expressão das proteínas na próstata canina e que há variação na expressão entre os diagnósticos avaliados.