



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROGÉRIO ANDERSON MARCASSO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp,
LESÕES HEPÁTICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E
EXPRESSÃO DE E-CADERINA NO FÍGADO DE CÃES**

ROGÉRIO ANDERSON MARCASSO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *Helicobacter* spp,
LESÕES HEPÁTICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E
EXPRESSÃO DE E-CADERINA NO FÍGADO DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível mestrado) – área de concentração: Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M313a Marcasso, Rogério Anderson.

Associação entre a presença de *Helicobacter* spp., lesões hepáticas, proliferação celular e expressão de E-caderina no fígado de cães / Rogério Anderson Marcasso. – Londrina, 2011.
69f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.
Inclui bibliografia.

1. Cão – Fígado – Doenças – Teses. 2. Células hepáticas – Proliferação – Teses. 3. Fígado – Histopatologia – Teses. 4. *Helicobacter* – Teses I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.7

ROGÉRIO ANDERSON MARCASSO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *Helicobacter* SPP., LESÕES
HEPÁTICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE E-
CADERINA NO FÍGADO DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (nível mestrado) – área de concentração: Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Giovana Wingeter Di Santis
UEL – Londrina – PR

Prof^ª. Dr^ª. Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina – PR

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula F.R.L. Bracarense
UEL – Londrina – PR

Londrina, 31 de Março de 2011

À Deus pela iluminação e à minha família e amigos
pela paciência.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Animal e Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL), em parceria com o Hospital Escola Veterinário, CCA, UEL.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1. **CAPES:** Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior.
2. **CNPq:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
3. **Fundação Araucária:** Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Paraná.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela iluminação e paciência, tanto na vida como na execução dessa dissertação e a tudo que Ele me proporcionou e me proporciona.

Aos meus pais, Rita e Isaias, por toda dedicação e paciência ao longo desses 9 anos que estou em Londrina, por todo o esforço financeiro e apoio irrestrito, conseguindo me fortalecer em tudo que sempre precisei e sempre me ajudarem a encontrar a solução mais inteligente para os problemas.

Ao meu irmão por todo apoio, sobretudo em relação às dúvidas de informática, sempre me socorrendo em todos os momentos que precisei.

À Prof.^a Mônica pela orientação profissional e pessoal que desde o meu segundo ano de graduação me disponibilizou, sempre me abrindo os olhos e fazendo enxergar a frente. Agradeço pela participação em decisões profissionais importantes, como a opção pelo mestrado e o gosto pela academia. Agradeço o exemplo profissional que em todos os momentos dos estágios, plantões e como professora responsável na residência ela soube demonstrar e me orientar.

À Prof.^a Ana Paula por ter me aceito como seu orientado, caindo de paraquedas na patologia. Agradeço toda a paciência e horas dispensadas tanto ao meu aprendizado profissional, quanto ao pessoal. Agradeço a paciência e mesmo fora do seu horário de trabalho, disponibilizar seu tempo a mim. Agradeço enormemente por toda orientação e apoio que permaneceu mesmo durante suas férias, sendo sempre muito atenciosa e dedicada.

Ao companheirismo dos amigos feito no laboratório. Agradeço a Rita pelo companheirismo, presença e apoio em todas as etapas desse trabalho, assumindo comigo responsabilidades e “pecadinhos” em todas as ocasiões. Agradeço a Joelma pelo tempo e paciência disponibilizados durante meu aprendizado e treinamento inicial na patologia. Agradeço a Raquel e Elisangela pela atenção e paciência em todos os procedimentos de rotina no laboratório de patologia animal.

À Prof.^a Giovana por todo tempo disponibilizado durante todo o desenvolvimento desse projeto. Agradeço todas as discussões que tivemos das técnicas e padronizações das imunistoquímicas, sendo sempre muito produtivas e esclarecedoras.

Ao Prof. Pedro por ter me aceito nesse projeto e por me despertar a curiosidade e o interesse pela *Helicobacter*.

Ao Prof. Amauri por ter me aceito no laboratório de virologia animal e possibilitado realizar parte desse trabalho.

Ao Prof. Antônio Carlos pelo acolhimento no laboratório de Patologia Animal e todo o ensinamento durante as necropsias que acompanhei.

À Juliana Rubira por todo companheirismo e apoio fundamental a conclusão desse trabalho. Agradeço todo o auxílio nas análises estatísticas, além da participação e apoio nos desafios e momentos de dificuldades.

À Luciana Takemura um dos pilares no meu treinamento e aprendizado na patologia animal. Agradeço toda a paciência e risadas durante esses dois anos. Mesmo quando cuidando da Laurinha, nunca deixou de me socorrer nos momentos que precisei, sendo sempre atenciosa e paciente. Teu “chaveirinho” agradece muito pelo exemplo de paciência e impecável modelo de convivência em grupo.

Aos residentes Raquel, Danilo e Elisângela por permitir que eu acompanhasse as necropsias da rotina, sempre me avisando quando havia casos de interesse ao projeto. Agradeço as discussões dos casos mais complicados e esclarecimentos.

As mestrandas Claudia e Noemi pela paciência e ensinamentos de biologia molecular, demonstrando técnicas e discutindo protocolos.

Ao convívio e atenção que recebi de todos, sempre muitos educados e prestativos, nos laboratórios de Patologia Animal: Cláudia, Kleber, Zé Carlos, Letícia, Karina, Reginaldo, Bianca, Stela e no de Virologia Animal,: Kerley, Juliana, Brígida, Michele, Aline, Rodrigo, Dal, Maria.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Departamento de Clínicas Veterinárias do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina-PR.

A todas as pessoas, amigos, colegas, que estiveram presentes durante esta fase sempre estimulando, apoiando e cooperando com o meu desenvolvimento.

MARCASSO, R. A. **Associação entre a presença de *Helicobacter* spp., lesões hepáticas, proliferação celular e expressão de E-caderina no fígado de cães.** 2011. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Em seres humanos a infecção por bactérias do gênero *Helicobacter* é uma importante causa de gastropatias, neoplasias gástricas e hepáticas. Cães são frequentemente infectados por diversas espécies de helicobactérias, no entanto a associação entre a infecção e a ocorrência de lesões hepáticas e biliares é controversa. Ainda hoje a maioria das hepatopatias em cães é classificada como idiopática. Os objetivos deste estudo foram *i.* avaliar a associação entre a ocorrência de alterações histológicas no fígado de cães e alterações na proliferação de hepatócitos e expressão de E-caderina; *ii.* avaliar a ocorrência de *Helicobacter* spp. no fígado de cães e sua associação com alterações hepáticas, na proliferação celular e na expressão de E-caderina. Foram selecionados 39 cães, entre outubro de 2008 a outubro de 2010, pacientes do Hospital Veterinário da UEL, cuja necropsia pode ser realizada até 30 minutos após o óbito. Fragmentos de fígado foram submetidos à análise histopatológica, à determinação do gênero *Helicobacter* pela PCR, à avaliação da proliferação celular pelo método histoquímico AgNOR e imunoistoquímico anti-Ki-67 e ainda, avaliação da expressão de E-caderina. Constataram-se alterações histológicas em 33 (84,6%) animais que foram classificadas como discretas (10/39), moderadas (10/39) e graves (13/39). Seis amostras não apresentaram lesões. Aumento significativo na proliferação de hepatócitos foi observado nos animais com lesão hepática, no entanto a expressão de E-caderina não diferiu entre os grupos com e sem lesão. Amostras de sete animais (7/39) foram positivas à PCR para o gênero *Helicobacter*. As principais alterações histológicas nestes animais foram congestão moderada (4/7), desorganização trabecular (6/7), degeneração vacuolar de hepatócitos (4/7), infiltrado inflamatório mononuclear periportal (6/7) e necrose (2/7). Verificou-se aumento significativo na proliferação de hepatócitos nos animais infectados quando avaliados pelo método AgNOR. A expressão de E-caderina não diferiu entre os animais infectados e não infectados. Assim, concluiu-se que as alterações histológicas hepáticas são frequentes em cães sem sinais clínicos de hepatopatia, sendo os principais achados congestão, desorganização trabecular de hepatócitos e infiltrado inflamatório crônico, havendo associação entre aumento da proliferação celular e a ocorrência de lesões. Os resultados sugerem que a presença do *Helicobacter* spp. no fígado de cães propicia um meio inflamatório que pode contribuir com o aumento da proliferação celular e assim modular a carcinogênese hepática.

Palavras-chaves: AgNOR. Imunoistoquímica. Ki-67. E-caderina. Proliferação celular

MARCASSO, R.A. **Association between *Helicobacter* spp., hepatic injury, cellular proliferation and expression of E-cadherin in the liver of dogs.** 2011. 69p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

In humans, infection with bacteria *Helicobacter* spp. is an important cause of stomach diseases, gastric and hepatic neoplasias. Dogs are often infected by several species of helicobacter, but the association between infection and the occurrence of liver damage and gallstones is controversial. Even today the majority of liver diseases in dogs are classified as idiopathic. The objectives of this study were i. evaluate the association between the occurrence of histological lesions in the liver of dogs and changes in hepatocyte proliferation and expression of E-cadherin, and ii. evaluate the occurrence of *Helicobacter* spp. in the liver of dogs and their association with liver, cell proliferation and expression of E-cadherin. It was selected 39 dogs from October 2008 to October 2010, patients in the Veterinary Hospital of the UEL, whose necropsy could be performed until 30 minutes after death. Liver fragments were subjected to histological analysis, the determination of the genus *Helicobacter* by PCR, the assessment of cell proliferation by AgNOR histochemical method and immunohistochemistry anti-Ki-67 and also assessed the expression of E-cadherin. Histological changes were noted in 33 (84.6%) animals that were classified as mild (10/39), moderate (10/39) and severe (13/39). Six samples showed no lesions. Significant increase in hepatocyte proliferation was observed in animals with liver injury, however the expression of E-cadherin did not differ between groups with and without injury. Samples of seven livers (7 / 39) were positive to PCR for the genus *Helicobacter* spp. The main histological changes in these animals were moderate congestion (4 / 7), trabecular disorganization (6 / 7), vacuolar degeneration of hepatocytes (4 / 7), mononuclear periportal (6 / 7) and necrosis (2 / 7). There was a significant increase in hepatocyte proliferation in infected ones as assessed by the AgNOR method. The expression of E-cadherin did not differ between infected and uninfected animals. Thus, it was concluded that the histological liver are common in dogs without clinical signs of liver disease, the main findings congestion, trabecular disorganization of hepatocytes and chronic inflammatory infiltrate, with an association between cellular proliferation and the occurrence of injuries. The results suggest that the presence of *Helicobacter* spp. in the liver of dogs provides an inflammatory environment that can contribute to the increased cell proliferation and thereby modulate hepatocarcinogenesis.

KEYWORDS: AgNOR. Immunohistochemistry. Ki-67. E-cadherin. Cell proliferation

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Alterações histológicas hepáticas segundo score de intensidade de lesões presentes nos grupos de cães classificadas pelo HE. Londrina, 2011	33
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Tabela 1 – Quantificação da proliferação celular no fígado de cães classificados nos grupos 1 a 4, utilizando método histoquímico de AgNOR (valores de médias \pm desvio padrão). Londrina, 2011	35
--	----

ARTIGO 2

Tabela 1 – Quantificação da proliferação celular (valores de média \pm desvio padrão) no fígado de cães do grupo controle e dos grupos com lesões hepáticas positivo e negativo à PCR para <i>Helicobacter</i> spp, respectivamente, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2011	52
---	----

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- Figura 1** –Fotomicrografias de tecido hepático de cães. A) Tecido hepático normal (G1). HE. Objetiva de 20x. B) Presença de infiltrado inflamatório moderado periportal (seta), (G2). HE. Objetiva de 40x. C) Degeneração vacuolar grave (cabeças de setas), (G3). HE. Objetiva de 20x. D) Necrose centrolobular (círculo), (G4). HE. Objetiva de 20x. Londrina, 2011 33
- Figura 2** –Índice de alterações histológicas (IAH) no fígado de cães com diferentes graus de lesão. G1 – fígado sem alterações, G2 – fígado com alterações discretas, G3- fígado com alterações moderadas, G4 – fígado com alterações intensas. Letras diferentes, significância estatística: G1xG2 p = 3,64E-03; G1xG3 p = 1,14E-06; G1xG4 p = 4,11E-11. Londrina, 2011.Londrina, 2011 34
- Figura 3** –Fotomicrografia de fígado de cão. Observa-se as NORs dos hepatócitos (setas), na maioria deles com dois ou mais pontos impregnados pela prata. AgNOR, objetiva de 100X. Londrina, 2011 35
- Figura 4** –Fotomicrografia de fígado de cão (G4). Observa-se hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 (setas). Imunoistoquímica, objetiva de 40x. Londrina, 2011 36
- Figura 5** –Número de hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 no exame imunoistoquímico. Londrina, 2011..... 37
- Figura 6** –Fotomicrografia de fígado de cães. A) Hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-E-caderina com padrão forte e homogêneo. Imunoistoquímica, objetiva de 40x. B) Hepatócitos imunoreagentes com marcação fraca e heterogênea ao anticorpo anti-E-caderina, principalmente na área com degeneração vacuolar (seta). Imunoistoquímica, objetiva de 40x. Londrina, 2011 37

Figura 7 – Demonstração das porcentagens de marcação na imunistoquímica anti-E-caderina em fígado de cães. G1 histologicamente normais, G2 alterações histológicas discretas, G3 alterações histológicas moderadas e G4 alterações histológicas graves. Marcação forte e homogênea: G1 50%; G2 40%; G3 80%; G4 73% e marcação fraca e heterogênea: G1 50%; G2 60%; G3 20% e G4 27%. Londrina, 2011 38

ARTIGO 2

Figura 1 – Fotomicrografia de fígado de cão. A) Congestão em toda a área. HE. Objetiva 40x. B) Desorganização trabecular (área delimitada por setas). HE. Objetiva 40x. C) Degeneração vacuolar intensa em hepatócitos (área delimitada por estrelas) e infiltrado inflamatório mononuclear (cabeça de seta). HE. Objetiva 20x. D) Necrose centrolobular (círculo). HE. 40x. Londrina, 2011 50

Figura 2 – Média do índice de alterações histológicas hepáticas (IAH) em cães. G1 (IAH = 123,5); G2 (IAH = 193,4); G3 (IAH = 227,2). Teste de Dunn: letras diferentes, significância estatística: G1xG2: $p < 0,05$; G1xG3: $p < 0,001$. G1 = grupo não infectado e sem alterações histológicas, G2 = grupo infectado e com alterações histológicas; G3 = grupo não infectado e com alterações histológicas. Londrina, 2011 50

Figura 3 – Fotomicrografia de fígado de cão. Observam-se circundadas as NORs dos hepatócitos e nos quadros, os respectivos perímetros e áreas. AgNOR, objetiva de 100X. Londrina, 2011 51

Figura 4 – Número de hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 no exame imunistoquímico. Londrina, 2011 52

Figura 5 – Demonstração das porcentagens de marcação na imunistoquímica anti-E-caderina em fígado de cães. G1 = grupo não infectado e sem alterações histológicas, G2 = grupo infectado e com alterações histológicas; G3 = grupo não infectado e com alterações histológicas. Teste de Fisher: G1xG2 $p = 1,00$; G1xG3 $p = 0,64$; G2xG3 $p = 0,39$. Marcação forte e homogênea: G1 50%; G2 43% e G3 65% e marcação fraca e heterogênea: G1 50%; G2 57% e G3 35%. Londrina, 2011 53

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 “ <i>HELICOBACTER</i> SPP. E DOENÇAS HEPÁTICAS EM CÃES”	15
1.2 REFERÊNCIAS	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 GERAL	26
2.2 ESPECÍFICOS	26
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	27
3.1 “ASSOCIAÇÃO ENTRE LESÕES HISTOLÓGICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE E-CA-DERINA NO FÍGADO DE CÃES”	27
3.1.1 Introdução	28
3.1.2 Material e Métodos	29
3.1.2.1 Análise Estatística	31
3.1.3 Resultados	32
3.1.3.1 Animais	32
3.1.3.2 Exame Histopatológico	32
3.1.3.3 Exame Histoquímico	34
3.1.3.4 Exame Imunoistoquímico	36
3.1.4 Discussão	38
3.1.5 Referências	40
3.2 “ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE <i>HELICOBACTER</i> SPP. E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO DE CÃES”	43
3.2.1 Introdução	44
3.2.2 Material e Métodos	45
3.2.2.1 Amostras	45
3.2.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	45
3.2.2.3 Exame histopatológico	46
3.2.2.4 Exame imunoistoquímico	47
3.2.2.5 Análise estatística	48
3.2.3 Resultados	48
3.2.3.1 Quadro clínico	48

3.2.3.2 PCR.....	49
3.2.3.3 Exame histopatológico	49
3.2.3.4 Exame histoquímico e imunoistoquímico	51
3.2.4 Discussão	53
3.2.5 Referências	56
CONCLUSÕES.....	59
ANEXOS	60
Anexo A – Lista de Reagentes e Produtos	61
Anexo B – Soluções e Tampão	63
Anexo C – Protocolos de Técnicas	65

1 REVISÃO DA LITERATURA:

1.1 “*HELICOBACTER* SPP. E DOENÇAS HEPÁTICAS EM CÃES”

RESUMO: A infecção da mucosa gástrica de seres humanos por bactérias do gênero *Helicobacter* é importante causa de gastropatias e neoplasias gástricas. O *Helicobacter pylori* induz a produção de adesinas e citotoxinas que promovem a proliferação celular e apoptose. Diversos estudos sugeriram a interação entre a infecção hepática por helicobactérias e o desenvolvimento de câncer hepático, biliar e pancreático. No entanto, os fatores envolvidos na colonização do fígado e vias biliares, bem como os mecanismos de patogenicidade destas espécies ainda são pouco compreendidos. Em humanos, aproximadamente 15% das neoplasias malignas estão associados a infecções crônicas e tanto a infecção bacteriana como a replicação viral nos hepatócitos pode alterar o perfil das citocinas locais e as respostas de proliferação celular ou apoptose das células infectadas. É interessante notar que ainda hoje a maioria das hepatites primárias é classificada como de origem idiopática. A avaliação da proliferação celular através da imunistoquímica com anticorpo anti-Ki-67 e do AgNOR em amostras de biópsias hepáticas contribui para o diagnóstico precoce e consequentemente, estabelece um prognóstico melhor para hepatopatias e neoplasias hepáticas. As caderinas são proteínas transmembrana dependentes do íon cálcio e que compõem as junções de adesão celular, entretanto, a função da E-caderina no epitélio normal e o impacto de sua perda na formação e estabelecimento de neoplasias não está totalmente elucidado. Assim, a detecção e a classificação das lesões hepáticas e das alterações na proliferação celular em cães com *Helicobacter* spp. fornecem informações importantes para o entendimento do papel desta infecção na etiologia da neoplasia hepática.

Palavras chaves: AgNOR. Imunoistoquímica. Ki-67. E-caderina. Proliferação celular

ABSTRACT: *Helicobacter* infection of the gastric mucosa in humans is an important cause of stomach diseases and gastric neoplasias. *Helicobacter pylori* induces the production of adhesins and cytotoxins that induce alterations in cell proliferation and apoptosis. Several studies have suggested the interaction between helicobacter infection and the development of liver, biliary and pancreatic cancer. However, the factors involved in colonization of liver and bile ducts, as well as the pathogenic mechanisms of these species are still poorly understood. Approximately 15% of malignant neoplasms are associated with both chronic infections and bacterial infection such as viral replication in hepatocytes can alter the local cytokine response and cell proliferation or apoptosis of infected cells. It is interesting to note that even today the majority of primary hepatitis are classified as idiopathic. The assessment of cell proliferation by immunohistochemical staining with anti-Ki-67 and AgNOR in liver biopsies contributes to early diagnosis and therefore improves the prognosis of liver and hepatic neoplasms, which incidence has been increasing and continue to be diagnosed in advanced stages. Cadherins are transmembrane proteins of the calcium ion dependent and that comprise the cell adhesion junctions, however, the function of E-cadherin in normal epithelium and understanding of their loss in the formation and establishment of neoplasia is not fully elucidated. Thus, the understanding of liver damage and alterations in cell proliferation present in dogs with *Helicobacter* spp. provides essential information for understanding whether this infection could be incriminated as a cause or a factor associated with risk of liver cancer.

Key words: AgNOR. Immunohistochemistry. Ki-67. E-cadherin. Cell proliferation

Bactérias do gênero *Helicobacter* têm sido observadas desde o final do século XIX, infectando o estômago de humanos e espécies animais como cães, gatos, furões, suínos, algumas espécies de macacos (HERMANNNS et al., 1995), tigres, onças pardas, jaguatiricas e gatos do mato (CATTOLI et al., 2000; CAMARGO et al., 2011), golfinhos e baleias (HARPER et al., 2000), ursos polares (OXLEY et al., 2005) e coelhos (VAN den BULCK et al., 2005). A comprovação da patogenicidade do *H. pylori* na etiologia das gastropatias em pessoas, levou-a categoria de moléstia infecciosa com grande impacto na saúde pública (BUCKLEY e O'MORAIN, 1998), sendo em 1994 a primeira bactéria a ser classificada como carcinógeno tipo I pela *Internacional Agency for Research on Cancer* (PELLICANO et al., 2008).

A espécie *H. pylori* é sensível ao pH ácido do suco gástrico e uma das suas características mais marcantes é a capacidade de produção da urease, capaz de catalisar a uréia em amônia e bicarbonato, propiciando um meio alcalino, permitindo sua subsistência em meio ácido (MARSHALL et al., 1987). Seus flagelos lhe conferem motilidade e capacidade de penetração no muco gástrico e migração para as junções intercelulares, local de alta concentração de nutrientes, meio de microaerofilia e pH alcalino (HAZELL et al., 1986).

O *H. pylori* pode aderir à mucosa gástrica devido principalmente à BabA, uma adesina presente na sua superfície, tornando viável a penetração de produtos antigênicos nas células da mucosa e dificultando a sua eliminação pelo indivíduo infectado, resultando em resposta imune persistente (STABILE et al., 2005). O *H. pylori* ainda produz duas citotoxinas relacionadas à sua patogenicidade, que são a *cytotoxin-associated gene A* (CagA) e a *vacuolating associated cytotoxin* (VacA). A CagA induz a produção de citotoxinas (SHIMADA e TERANO, 1998), estimulando a proliferação celular, apoptose, motilidade celular bacteriana e expressão de resposta imune (BLASER e ATHERTON, 2004). Já a VacA induz principalmente a vacuolização (LEUNK et al, 1998), apoptose de células epiteliais (GALMICHE et al, 2000) e imunomodulação (BLASER e ATHERTON 2004). Assim, a infecção bacteriana pode levar a ruptura da barreira da mucosa gástrica e à indução de uma variedade de mediadores inflamatórios (TORRES et al., 2000) que intensificam a apoptose e o renovação celular. A intensidade da inflamação gástrica por *H. pylori* em humanos é decorrente de uma complexa interação entre as características do hospedeiro e dos fatores de virulência da helicobactéria, definindo dessa forma a extensão da lesão (DEL GIUDICE e MICHETTI, 2004).

Há evidências de que 67 a 100% de cães saudáveis albergam pelo menos uma espécie de *Helicobacter* gástrico (NEIGER e SIMPSON, 2000). Os tipos de lesões gástricas

mais frequentes listados em cães infectados com *Helicobacter* spp. são a degeneração glandular com acúmulo de linfócitos e neutrófilos, fibrose e edema de lâmina própria, presença de folículos linfóides e de infiltrados inflamatórios (HERMANS et al., 1995). Em seres humanos, a espécie *H. pylori* tem sido considerada a principal causa de gastrite, úlceras pépticas, e ainda está relacionada a neoplasias gástricas como o adenocarcinoma e o linfoma do tipo MALT (MORGNER et al., 2000).

A busca por maiores conhecimentos a respeito destas bactérias levou ao descobrimento de novas espécies que colonizam a mucosa gástrica, e outras localizadas no intestino, no trato biliar e no fígado, tanto de homens como de animais. Assim, vários estudos tentaram desvendar se as diferentes espécies de *Helicobacter* podem estar envolvidas na formação de cálculos vesicais e no desenvolvimento de outras doenças hepatobiliares, incluindo neoplasias.

Aproximadamente 15% dos neoplasmas malignos em humanos estão associados a infecções crônicas, como por exemplo o carcinoma hepatocelular e os vírus da hepatite B e C, o adenocarcinoma gástrico e a bactéria *Helicobacter pylori* e o carcinoma colangiocelular e o trematódeo *Opisthorchis viverrini* (COUSSENS e WERB, 2002). Algumas bactérias são documentadas infreqüentemente em hepatites caninas, como a *Yersinia pseudotuberculosis*, *Samonella* spp. e raramente *Clostridium piliforme*. Bactérias entéricas gram negativas são os microorganismos mais comumente isolados de cães com colecistite (FOX et al., 1996).

Tanto a infecção bacteriana como a replicação viral nos hepatócitos podem alterar as citocinas locais e as respostas de proliferação celular ou apoptose das células infectadas. A resposta imune às proteínas virais pode resultar em um estado de inflamação crônica (COUSSENS e WERB, 2002) e, segundo Rogers et al. (2004) a carcinogênese hepática pode estar relacionada à progressão da hepatite crônica. Rocha et al. (2005) observaram a existência de associação entre a hepatite C e presença de *Helicobacter* no fígado de pessoas com cirrose.

O mecanismo pelo qual certas espécies de *Helicobacter* colonizam o fígado é desconhecido, entretanto especula-se que possa ser por meio da translocação direta do intestino ou pela circulação hepática (FOX et al., 1996). A presença de *Helicobacter* spp. foi descrita no fígado de humanos e de cães e tem sido sugerida uma associação entre a bactéria e o desenvolvimento de cirrose em humanos (PELLICANO et al., 2008) e do carcinoma hepatocelular em ratos (ITO et at., 2008). Lin et al. (1995) detectaram DNA de *H. pylori* na bile de pacientes com câncer pancreático e Fox et al. (1998), em um estudo com pacientes

portadores de colecistite crônica, sugeriram a participação das espécies *H. bilis*, “*Flexispira rappini*” e *H. pullorum* no câncer de vesícula biliar. Huang et al. (2004) observaram bactérias semelhantes a *H. pylori* em pacientes humanos com carcinoma hepatocelular e sugeriram que a presença da bactéria no fígado provavelmente estaria ligada ao processo de carcinogênese hepática. No entanto, a rota patogênica gástrica e enterohepática da *Helicobacter* spp. ainda não foi compreendida (PRACHASILPCHAI et al., 2007; RECORDATI et al., 2007).

Fox et al. (1996) isolaram *H. canis* a partir do fígado de um cão com hepatite necrotizante multifocal, sugerindo que esta bactéria poderia ser a causa de hepatites idiopáticas em mamíferos. É interessante notar que ainda hoje a maioria das hepatites primárias é classificada como de origem idiopática (FAVIER, 2009).

Em experimentos com animais de laboratório foi demonstrada a associação entre infecção hepática por *H. hepaticus* e *H. bilis*, hepatite e desenvolvimento de câncer hepático (FOX et al., 1996; ITO et al., 2008). Estes animais quando infectados apresentam lesão hepática multifocal progressiva com colangite e vasculite, que progredia para hiperplasia de ductos biliares, hiperplasia de células redondas, proliferação hepatocelular, hepatoma ou carcinoma hepatocelular (FOX et al., 1997, ROGERS et al. 2004). Também foi sugerido que a infecção por *Helicobacter* spp. em ferrets poderia ser a causa de hepatopatia observada nestes animais (GARCIA et al., 2002).

Em medicina são utilizadas técnicas histoquímicas e imunoistoquímicas para a avaliação do efeito da infecção por *H. pylori* na proliferação celular de células epiteliais gástricas (DE FREITAS et al., 2004). A técnica histoquímica *Argyrophil Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR) evidencia unidades funcionais do nucléolo onde estão localizados todos os componentes necessários para a síntese do RNA ribossômico (PLOTON et al., 1986; BORZIO et al., 1998; MARTÍN et al., 2005). Duas proteínas argirofílicas (nucleolina e nucleofosmina) envolvidas no processo de transcrição do RNA ribossômico, de 18S a 28S, situados no nucléolo, estão associadas à fase de interfase do ciclo celular. No homem, estas regiões correspondem a constrições secundárias e se localizam no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 (OSHIMA e FORONES, 2001). Como as AgNORS estão associados aos cromossomos acrocêntricos pensou-se inicialmente que estivessem relacionados à ploidia, entretando, comparando-os aos métodos imunocitogenéticos, como a citometria de fluxo e a imunoreatividade com o Ki-67, descobriu-se que as AgNORS estão associadas principalmente à proliferação celular (OSHIMA e FORONES, 2001).

Ploton et al. (1986) padronizaram uma versão modificada da técnica de coloração pela prata, realizando a reação em uma só fase à temperatura ambiente (20°C) e penumbra, o que permitiu que tais regiões fossem vistas em cortes de tecido em parafina, fixadas em formalina em células tanto em metáfase como em intérfase. Em 1989, Crocker et al. sugeriram que a técnica de AgNOR seria útil para a demonstração do potencial neoplásico e para a avaliação prognóstica e da agressividade de neoplasias malignas, sendo utilizada como marcador da atividade celular e nucleolar.

Essas proteínas argirofílicas são facilmente marcadas pelo nitrato de prata, promovendo a visualização dessa fase à microscopia óptica, tanto nas preparações citológicas quanto histopatológicas de rotina. O número dessas regiões está estritamente relacionado à atividade de transcrição das células em proliferação e daquelas que estão sofrendo rápida proliferação celular (DERENZINI, 2000). São, portanto, mais numerosos em células em proliferação, aumentando durante a fase G1 e atingindo seu pico máximo na fase S e quanto menor a duração do ciclo celular, maior a quantidade de AgNORs (MARTÍN et al., 2005).

A análise qualitativa (parâmetros morfométricos e morfológicos) das NORs demonstra que em lesões malignas, além de em maior número, as AgNORS estão diminuídas de tamanho, dispersas pelo núcleo e com forma e contornos irregulares (CABRINI et al., 1992). Esse método foi utilizado com sucesso por Steininger et al. (1995) que verificaram que o número de AgNORs aumenta de acordo com a gravidade da lesão gástrica (de mucosa normal a crescentes graus de inflamação, metaplasia, displasia a adenocarcinoma), podendo contribuir no estabelecimento do prognóstico da doença.

Além do aumento no número de AgNORs ter sido observado em neoplasias hepáticas malignas, a atividade hepática proliferativa aumenta progressivamente nas lesões intermediárias não cancerígenas que precedem o carcinoma hepatocelular (BORZIO et al., 1998). Kitano et al. (2000), em um estudo de marcadores preneoplásicos na hepatocarcinogênese de ratos, relataram que a forma e a área dos NORs refletem a taxa de proliferação celular mais acuradamente do que seu número. Apesar de tumores hepatobiliares primários serem pouco frequentes em cães (THAMM, 2009), a hepatite crônica pode apresentar uma prevalência de 12% em cães (WATSON et al., 2010). Considerando a possibilidade de progressão de hepatites para tumores, a avaliação de índices de proliferação celular poderia contribuir como fator prognóstico. No entanto, não há dados na literatura a respeito de parâmetros de proliferação celular do parênquima hepático em cães e gatos saudáveis utilizando a técnica de AgNOR.

Um evento que ocorre na replicação do DNA, em tecidos normais e em células alteradas, é o surgimento do antígeno nuclear da proliferação celular (PCNA) (MARTINS et al., 2008). O PCNA é uma proteína nucleolar de proliferação altamente conservada que se expressa principalmente na fase S do ciclo celular, indicando que a célula está em processo de divisão ou em reparo do DNA (STROESCU et al., 2008). Já o surgimento do antígeno nuclear Ki-67, é um evento que ocorre apenas em células em proliferação, tanto em células normais quanto em alteradas, e é expressa nas fases G1, S, G2 e mitose, mas não se expressa na fase G0 do ciclo celular, indicando que a célula está em processo de divisão do DNA (STROESCU et al., 2008). O Ki-67 apresenta meia vida menor do que uma hora (BRUNO e DARZYNKIEWICZ, 1992).

No carcinoma hepatocelular, a expressão do Ki-67 apresenta uma relação direta com a taxa de crescimento tumoral (STROESCU et al., 2008). Deste modo, a avaliação de alterações da atividade proliferativa dos hepatócitos contribui para o diagnóstico precoce e consequentemente, com melhor prognóstico em hepatopatias neoplásicas e não neoplásicas, cuja incidência vem aumentando e continuam a ser diagnosticadas já em estágios avançados (KREMER-TAL et al., 2007).

As caderinas são proteínas transmembrana dependentes do íon cálcio e que compõem as junções de adesão celular. Estas proteínas desempenham importante função na comunicação entre células, na sinalização e diferenciação celular (SIMECKOVÁ et al., 2009; ZUCCARI et al., 2008). A diminuição na expressão de caderinas tem sido associada a neoplasias malignas com maior potencial de invasão e metástase (GUO et al., 2008). Entretanto, a expressão alterada da E-caderina também pode ser consequência da perda da ponte citoplasmática entre as proteínas (MOHAMET et al., 2010). Tem-se observado que a perda da expressão da E-caderina em células tronco embrionárias resulta em localização alterada na superfície celular de proteoglicanos, fator importante na formação da membrana. E ainda, tais efeitos não estão confinados apenas a adesão celular e motilidade, mas também a processos metabólicos primários, catabolismos, apoptose e diferenciação (MOHAMET et al., 2010). Há poucos estudos sobre a expressão da E-caderina em células epiteliais normais *in vivo* ou *in vitro*; e que geralmente avaliaram as alterações na expressão das caderinas em neoplasias ou linhagens celulares tumorais (GUO et al., 2008; MOHAMET et al., 2010). Assim, a função da E-caderina no epitélio normal e o entendimento de sua diminuição na formação e estabelecimento de neoplasias não está totalmente elucidado. É provável que não apenas a perda da expressão, mas também a expressão de E-caderina aberrante esteja associada ao potencial maligno e metastático (MOHAMET et al., 2010).

Assim, a detecção e identificação das lesões hepáticas e a avaliação do índice proliferativo em cães com *Helicobacter* spp. fornece informações fundamentais para o entendimento de se esta infecção pode ser incriminada como causa e/ou um fator associado ao risco de neoplasia hepática.

1.2 REFERÊNCIAS

- BLASER, M.J.; ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.321-333, 2004.
- BORZIO, M; TRERÈ, D; BORZIO, F; FERRARI, AR; BRUNO, S; RONCALLI, M.; COLLOREDO, G; LEANDRO, G; OLIVERI, F; DERENZINI, M. Hepatocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology** v.51, p.96-101, 1998.
- BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by ki-67 antibody in HL-60 cell. **Cell Proliferation**, v.25, n.1, p.31-40, 1992.
- BUCKLEY, M. J. M.; O’MORAIN, C. A. *Helicobacter* biology – discovery. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 1, p.7-16, Jan. 1998.
- CABRINI, R.L.; SCHWINT, A.E.; MENDEZ, A.; FEMOPASE, F.; LANFRANCHI, H.; ITOIZ, M.E. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v.21, p.275-279, 1992.
- CAMARGO, P.L.; UENAKA, S.A.; MOTTA, M.B.; ADANIA, C.H.; YAMASAKI, L.; ALFIERI, A.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Gastric *Helicobacter* spp. Infection in captive neotropical Brazilian feline. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.42, p.290-297, 2011.
- CATTOLI, G; BART, A.; KLAVER, P.S.J.; ROBIJN, R.J.; BEUMER, H.J.; VAN VUGT, R.; POT, R.G.J.; VAN DER GAGG, I.; VANDERBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J.G. *Helicobacter acinonychis* eradication leading to the resolution of gastric lesions in tigers. **The Veterinary Record**, n.147, p.164-165, 2000.
- COUSSENS, LM; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p. 860-867, 2002.
- CROCKER, J.; BOLDY, D.A.R.; EGAN, M.J. How should we count AgNOR? PROPOSALS FOR A STANDARDIZED APPROACH. **Journal Pathology**, v.158, p.185-188, 1989.
- DE FREITAS, D.; URBANO, M.; GOULAO, M.H.; DONATO, M.M.; BALDAIA, C.; MARTINS, M.I.; SOUTO, P.; GREGORITO, C.; FIGUEIREDO, P.; GOUVEIA, H.; ROMAOZINHO, J.M. The effects of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. **Hepatogastroenterology**, v.51, p.876-882, 2004.
- DEL GIUDICE, G; MICHETTI, P. Inflammation, immunity and vaccines for *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.9 (Suppl.), p.23-28, 2004.

DERENZINI, I.M. The AgNORs. **Micron**, v.31, n.2, p.117-120, 2000.

FAVIER, R.P. Idiopathic hepatitis and cirrhosis in dogs. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 39, p.481-488, 2009.

FOX, J.G.; DROLET, R.; HIGGINS, R.; MESSIER, S.; YAN, L.; COLEMAN, B.E.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E. *Helicobacter canis* isolated from a dog liver with multifocal necrotizing hepatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.10, p. 2479-2482, 1996.

FOX, J.G.; DANGLER, C.A.; SAGER, W.; BORKOWSKI, R.; GLIATTO, J.M. *Helicobacter mustelae*-associated gastric adenocarcinoma in ferrets (*Mustela putorius furo*). **Veterinary Pathology**, v.34, p.225-229, 1997.

FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; SHEN, Z.; TAYLOR, S.; PASTER, B.J.; ERICSON, R.L.; LAU, C.N.; CORREA, P.; ARAYA, J.C.; ROA, I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. **Gastroenterology**, v.114, n.4, p.55-763, 1998.

GALMICHE, A.; RASSOW, J.; DOYE, A.; CAGNOL, S.; CHAMBARD, J.C.; CONTAMIN, S.; De THILLOT, V.; JUST, I.; RICCI, V.; SOLCIA, E.; VAN OBERGHEN, E.; BOQUET, P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. **The EMBO Journal**, v.19, p.6361-6370, 2000.

GARCÍA, A.; ERDMAN, S.E.; XU, S.; FENG, Y.; ROGERS, A.B.; SCHRENZEL, M.D.; MURPHY, J.C.; FOX, J.G. Hepatobiliary inflammation, neoplasia, and argyrophilic bacteria in a Ferret colony. **Veterinary Pathology**, v.39, p.173-179, 2002.

GUO, C.; LIU, Q.G.; YANG, W.; ZHANG, Z.L.; YAO, Y.M. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, n.5, p.490-496, 2008.

HARPER, C.M.G.; DANGLER, C.A.; XU, S.; FENG, Y.; SHEN, Z.; SHEPPARD, B.; STAMPER, A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; FOX, J.G. Isolation and characterization of a *Helicobacter* sp. from the gastric mucosa of dolphins, *Lagenorhynchus acutus* and *Delphinus delphinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.11, p.4751-4757, 2000.

HAZELL, S.L.; LEE, A.; BRADY, L.; HENESSY, W. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus at important factors in colonization of the gastric epithelium. **The Journal of Infectious Disease**, v.153, p.658-663, 1986.

HERMANN, K.L.; KREGEL, K.; BREUNER, W.; LECHNER, J. *Helicobacter*-like organisms: histopathological examination of gastric biopsies from dogs and cats. **Journal of Comparative Pathology**, v.112, p.307-318, 1995.

HUANG, Y.; FAN, X.G.; WANG, Z.M.; ZHOU, J.H.; TIAN, X.F.; LI, N. Identification of helicobacter species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v.57, n.12, p.1273-1277, 2004.

ITO, K; YAMAOKA, Y; OTA, H; EL-ZIMAITY, H; GRAHAM, D.Y. Adherence, Internalization, and Persistence of *Helicobacter pylori* in Hepatocytes. **Digestive Disease Science**, v. 53, p. 2541-2549, 2008.

KITANO, M; WANIBUCHI, H; MORIMURA, K; SUKATA, T; SHIZUSAWA, M.; FUKUSHIMA, S. Morphological Changes in Silver-stained Nuclear Organizer Regions (AgNORs) Related to Proliferative Activity in Glutathione S-transferase Placental Form (GST-P) Positive Foci of Rat Liver. **Journal of Toxicology Pathology**, v.13, p.261-264, 2000.

KREMER-TAL, S.; NARLA, G.; CHEN, Y.M. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. **Journal Hepatology**, v.46, p.645-654, 2007.

LEUNK, A.; JOHNSON, P.T.; DAVID, B.C.; KRAFT, W.G.; MORGAN, D.R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pyloridis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.26, p.93-98, 1998.

LIN, T-T; YEH, C-T; WU, C-S; LIAW, Y-F. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. **Digestive Diseases and Sciences**, v.40, n.10, p.2214-2219, 1995.

MARSHALL, B.J.; BARRET, L.; PRAKASH, C.; McCALLUM, R.W.; GUERRANT, R.T. Survival of *Campylobacter pylori* associated gastritis and peptic ulcer disease at acid pH. **Gastroenterology**, v.92, p.1517, 1987.

MARTÍN, CA; SURUR, JM; GARCÍA, MN; CORRONS, F; BADRÁN, AF. Comparative study of DNA synthesis and nucleolar organizer regions of sinusoids littoral cells in mouse regenerating liver. **Biocell**, v.29, n.1, p.33-38, 2005.

MARTINS, AMCRPF; VASQUES-PEYSER, A; TORRES, LN; MATERA, JM; DAGLI, MLZ; GUERRA, JL. Retrospective – systematic study and quantitative analysis of cellular proliferation and apoptosis in normal, hyperplasic and neoplastic perineal glands. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.6, n.2, p.71-79, 2008.

MOHAMET, L.; HAWKINS, K.; WARD, C.M. Loss of function of E-cadherin in Embryonic stem cells and the revelance to models of tumorigenesis. **Journal of Oncology**, v.2011, p.1-19, 2010.

MORGNER, A.; LEHN, N.; ANDERSEN, L. P.; THIEDE, C.; MADS, B.; BENNEDSEN, M.; TREBESIUS, K.; NEUBAUER, B.; NEUBAUER, A.; STOLTE, M.; BAYERDÖRFFER, E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. **Gastroenterology**, v.118, p.821-828, 2000.

NEIGER, R.; SIMPSONO, K.W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.125-33, 2000.

OSHIMA, C.T.F.; FORONES, N.M. AgNOR EM CÂNCER GÁSTRICO. **Arquivo de Gastroenterologia**, v.38, n.2, p.89-93, 2001.

OXLEY, A.P.; ARGO, J.A.; McKAY, D.B. *Helicobacter* spp. from captive bottlenose dolphins (*Tursiops* spp.) and polar bears (*Ursus maritimus*). **Veterinary Journal**, v.170, n.3, p.77-80, 2005.

- PELLICANO, R.; MÉNARD, A.; RIZZETTO, M.; MÉGRAUD, F. Helicobacter species and liver diseases: association or causation? **The Lancet Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.254-260, 2008.
- PLOTON, D; MENAGER, M; JEANNESSON, P; HIMBER, G; PIGEON, F; ADNET, JJ. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. **Histochemical Journal**, v.18, p.5-14, 1986.
- PRACHASILPCHAI, W; NUANUALSUWAN, S; CHATSUWAN, T; TECHANGAMSUWAN, S; WANGNAITHAM, S AND SAILASUTA, A. Diagnosis of *Helicobacter* spp. Infection in canine stomach. **Journal Veterinary Science**, v.8, p.139-145, 2007.
- RECORDATI, C.; GUALDI, V.; TOSI, S.; FACCHINI, R.V.; PENGO, G.; LUINI, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. **Veterinary Microbiology**, v.199, n.2-4, p.346-351, 2007.
- ROCHA, M.; AVENAUD, P.; MÉNARD, A.; Le BAIL, B; BALAUD, C; BIOULAC-SAGE, P; MAGALHÃES, D.M.; MÉGRAUD, F. Association of Helicobacter species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. **Gut**, v.54, p.396-401, 2005.
- ROGERS, A.; BOUTIN, S.; WHARY, M.; SUNDINA, N.; GE, Z.; CORMIER, K.; FOX, J. Progression of Chronic Hepatitis and Preneoplasia in *Helicobacter hepaticus*-Infected A/JCr Mice. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n.6, p.668-677, 2004.
- SHIMADA, T.; TERANO, A. Chemokine expression in *Helicobacter pylori* infected gastric mucosa. **Journal of Gastroenterology**, v.33, p.613-617, 1998.
- SIMECKOVÁ, P.; VONDRÁČEK, J.; PROCHÁZKOVÁ, J.; KOZUBÍK, A.; KRCMÁR, P.; MACHALA, M. 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits beta-catenin-dependent transcription in liver epithelial cells. **Toxicology**, v.16, n.260, p.104-111, 2009.
- STABILE, B.E.; SMITH, B.R.; WEEKS, D.L. *Helicobacter pylori* infection and surgical disease – Part I. **Current Problems in Surgery**, v.42, p.756-789, 2005.
- STEININGER, H.; STREITBERG, U.V.; WUNDER, I.; FALLER, G.; KIRCHNER, T. Inflammatory, preneoplastic, and neoplastic changes of the gastric mucosa. **General and Diagnostic Pathology**, v.141, p.15-19, 1995.
- STROESCU, C.; DRAGNEA, A.; IVANOV, B.; PECHIANU, C.; HERLEA, V.; SGARBURA, O.; POPESCU, A. POPESCU, I. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, ki67 and PCNA and Prognostic Significance in Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Gastrointestinal Liver Disease**, v.17, n.4, p.411-417, 2008.
- THAMM, D.H. Neoplasias Hepáticas. In: DALECK, CR; DE NARDI, AB; RODASKI,S. **Oncologia em Cães e Gatos**. Rocca, cap. 20, p.329-334, 2009.
- TORRES, J.; PEREZ-PEREZ, G.; GOODMAN, K.J.; ATHERTON, J.C.; GOLD, B.D.; HARRIS, P.R.; IA GARZA, A.M.; GUARNER, J.; MUNOZ, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research**, v.31, p.431-469, 2000.

VAN DEN BULCK, K.; BAELE, M.; HERMANS, K.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUUCK, F.; DECOSTERE, A. First report on the occurrence of *Helicobacter heilmannii* in the stomach of rabbits. **Veterinary Research Communications**, v29, p.271-279, 2005.

WATSON, P.J.; ROULOIS, A.J.; SCASE, T.J.; IRVINE, R.; HERRTAGE, M.E. Prevalence of hepatic lesions at post-mortem examination in dogs and association with pancreatitis. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, n.11, p.566-572, 2010.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUÍZ, C.M.; ANDRADE, J.C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.207-215, 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Associar a presença de *Helicobacter* spp. com alterações histológicas, proliferação e adesão celular do fígado de cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar histologicamente alterações do parênquima hepático de cães na presença ou não de *Helicobacter* spp.;
- Comparar os índices de proliferação celular de hepatócitos de cães na presença ou não de *Helicobacter* spp. utilizando métodos histoquímico AgNOR e imunoistoquímico anti-Ki-67;
- Analisar E-caderina pelo método da imunoistoquímica as alterações na adesão celular do parênquima hepático de cães na presença ou não de *Helicobacter* spp.;
- Comparar os índices de proliferação celular de hepatócitos de cães com diferentes graus de lesões histológicas através dos métodos histoquímico AgNOR e imunoistoquímico anti-Ki-67;
- Analisar E-caderina pelo método da imunoistoquímica as alterações na adesão celular do parênquima hepático de cães na presença de diferentes graus de lesões histológicas.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 “ASSOCIAÇÃO ENTRE LESÕES HISTOLÓGICAS, PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DE E-CADERINA NO FÍGADO DE CÃES”

RESUMO: Lesões hepáticas agudas e crônicas podem progredir para insuficiência hepática fatal em animais e seres humanos. Tanto a infecção bacteriana como a replicação viral nos hepatócitos podem induzir a produção de citocinas locais que irão modular a proliferação e/ou apoptose das células infectadas. O objetivo do presente estudo foi associar diferentes graus de lesões histológicas hepáticas com alterações na proliferação celular e na expressão de E-caderina no fígado de cães. Fragmentos de fígado de 39 cães foram colhidos e submetidos à preparação histológica pela hematoxilina-eosina. As alterações histológicas foram classificadas e quantificadas em um índice de alteração histológica. A proliferação celular foi avaliada por meio do método histoquímico AgNOR e imunoistoquímico com o anticorpo anti-Ki-67. A expressão da E-caderina foi avaliada por meio do método imunoistoquímico com o anticorpo anti-E-caderina. Alterações histológicas foram constatadas em 33 animais, sendo a intensidade discreta em 10, moderada em 10 e grave em 13. As principais lesões observadas foram congestão, desorganização trabecular e infiltrado inflamatório mononuclear. Constatou-se aumento significativo na proliferação de hepatócitos nos animais com alterações histológicas em relação ao grupo sem alterações. A expressão de E-caderina foi semelhante nos animais com e sem lesões hepáticas. Assim, concluiu-se que as alterações histológicas hepáticas são frequentes em cães sem sinais clínicos de hepatopatia e que o aumento da proliferação de hepatócitos está associado às alterações microscópicas.

Palavras Chaves: AgNOR. Imunoistoquímica. Ki-67. Histologia. Biomarcadores

ABSTRACT: Acute and chronic liver injury may progress to fatal liver failure in animals and humans. Both bacterial and viral replication in hepatocytes may induce local production of cytokines that will modulate the proliferation and / or apoptosis of infected cells. The aim of this study was to associate different degrees of liver histological lesions with alterations in proliferation and cell adhesion in the liver of dogs. Liver samples were collected from 39 dogs without signs of liver disease that died for various diseases. Aiming to quantify the histological liver lesions, the intensity of changes such as congestion, trabecular disorganization, inflammatory infiltration, degeneration and necrosis was evaluated and graded on a score of 1 to 4, and thus, the histological sections of liver were classified into four groups: no changes (G1), mild changes (G2), moderate (G3) and severe (G4). For analysis of cell proliferation, it was used the modified AgNOR histochemical method in 38 (38/39) dogs by assessing the number and area of NORs in a total of 200 hepatocytes and immunohistochemistry anti-Ki-67 in 39 dogs counting cells immunoreagents in 800 hepatocytes. Cell adhesion was evaluated by immunohistochemistry anti-E-cadherin in 39 liver samples. In AgNOR was observed a significant increase in the NORs of the groups with mild to moderate changes comparing to the group without changes. Immunoreagents cells to Ki-67 had a significant increase with increasing severity of the injury. In the anti-E-cadherin immunohistochemistry it was no difference between the groups. Thus, it was concluded that histological liver are common in dogs without clinical signs of liver disease and its main findings in animals with moderate to severe histological lesions were chronic inflammatory infiltration and necrosis, beyond the increase in cell proliferation.

Key words: AgNOR. Immunohistochemistry. Ki-67. Histology. Biomarkers

3.1.1 Introdução

Lesões hepáticas agudas e crônicas podem progredir para insuficiência hepática fatal em animais e seres humanos. Hipóxia, toxinas, bactérias, vírus, medicamentos, distúrbios metabólicos e nutricionais são alguns dos agentes que podem causar lesão aos hepatócitos. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das lesões e no subsequente reparo pode contribuir para ampliar estratégias terapêuticas e melhorar o prognóstico de pacientes com hepatopatias (INGH et al., 2006).

No homem, diversos agentes infecciosos foram associados ao desenvolvimento de neoplasias hepáticas, como o vírus da hepatite B e o trematódeo de vias biliares *Opisthorchis viverrini*. Estima-se que 15% dos tumores malignos estejam relacionados à inflamação crônica induzida por agentes infecciosos (COUSSENS e WERB, 2002). Tanto a infecção bacteriana como a replicação viral nos hepatócitos podem induzir a produção de citocinas locais que irão modular a proliferação ou apoptose celular. A continuidade deste processo pode resultar em uma neoplasia hepática (ROGERS et al., 2004).

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são alças de DNA localizadas nos cromossomos acrocêntricos que participam da transcrição do RNA ribossômico e estão associadas a várias proteínas (nucleolina e nucleofosmina) com propriedades argirofílicas. A técnica histoquímica *Argyrophil Nucleolar Organizer Regions* (AgNOR) evidencia as proteínas associadas a estas unidades funcionais do nucléolo como pontos negros no núcleo. Devido a estas características, a análise morfométrica das NORs pode ser relacionada ao ciclo celular e reflete a atividade proliferativa de células neoplásicas e hiperplásicas (TRERÈ, 2000). A relação entre a expressão das proteínas AgNOR e a hepatocarcinogênese tem sido demonstrada em modelos animais e no homem (AOKI et al., 1994; BORZIO et al., 1998; KITANO et al., 2000)

Um evento que ocorre na replicação do DNA, em tecidos normais e em células alteradas, é o surgimento do antígeno nuclear Ki-67, expresso principalmente nas fases G1, S, G2 e mitose. No carcinoma hepatocelular, a expressão do Ki-67 apresenta uma relação direta com a taxa de crescimento tumoral (STROESCU et al., 2008). Deste modo pode-se avaliar alterações da atividade proliferativa dos hepatócitos por meio de biópsias e contribuir para o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, para a melhora do prognóstico, inclusive de neoplasias hepáticas, cuja incidência vem aumentando e continuam a ser diagnosticadas em estágios avançados mesmo em humanos (KREMER-TAL et al., 2007).

As caderinas são proteínas transmembrana dependentes do íon cálcio e que compõem as junções de adesão celular. Estas proteínas desempenham importante função na comunicação entre células, na sinalização e diferenciação celular (SIMECKOVÁ et al., 2009; ZUCCARI et al., 2008). A diminuição na expressão de caderinas tem sido associada a neoplasias malignas com maior potencial de invasão e metástase (GUO et al., 2008). Há poucas informações sobre a expressão da E-caderina em hepatócitos normais *in vivo* ou *in vitro*; a maioria dos trabalhos avalia alterações na expressão das caderinas em neoplasias ou linhagens celulares tumorais (MOHAMED et al., 2010). Assim, a função da E-caderina em células normais e o entendimento de sua perda na formação e estabelecimento de neoplasias não está totalmente elucidado. É provável que não apenas a perda da expressão, mas também a expressão de E-caderina aberrante esteja associada ao potencial maligno e metastático (MOHAMED et al., 2010).

Lesões hepáticas em cães relacionadas a agentes etiológicos diversos são bem documentadas na literatura (INGH et al., 2006). No entanto, nem sempre os achados histológicos revelam a causa da lesão, sendo possível apenas estimar o grau de comprometimento hepático e a provável evolução. Considerando que processos crônicos podem contribuir com a carcinogênese hepática, a busca por biomarcadores que indiquem essa transformação tem recebido atenção. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar alterações na proliferação celular e na expressão de E-caderina no fígado de cães com lesões não neoplásicas.

3.1.2 Material e Métodos

Após prévia aprovação pelo comitê de ética, selecionou-se 39 cães, no período de outubro de 2008 a outubro de 2010, pacientes do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HVU – UEL), que morreram ou foram submetidos à eutanásia devido à doença primária. Foram incluídos apenas os cães cuja necropsia pode ser realizada até 30 minutos após o óbito. Os prontuários dos animais foram examinados posteriormente para determinação do quadro clínico principal.

Os animais foram submetidos à necropsia padrão. O fígado foi removido para análise macroscópica. Foram colhidas duas amostras de 0,5 cm de diâmetro do fígado de cada animal da região central dos lobos hepáticos.

Os fragmentos foram fixados em solução de formalina 10% tamponada durante 24 horas, e depois mantidos em álcool 70% até o momento do processamento

histológico. Seguiu-se a desidratação em série crescente de alcoóis, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram corados pelo método de hematoxilina-eosina para avaliação das alterações. A intensidade das lesões foi classificada em escores de 1 a 4 para o qual foram consideradas a presença de congestão, desorganização trabecular, infiltrado inflamatório, degeneração e necrose, e o percentual de área do corte alterada. Com o objetivo de quantificar as lesões histológicas hepáticas a intensidade das alterações foi classificada por escores: (1) ausência de alterações; (2) discreta (menos de 25% do corte); (3) moderada (de 25 a 50% do corte) e (4) grave (mais de 50% do corte). Animais com diagnóstico de neoplasia hepática primária ou metastática foram excluídos do estudo.

Cada alteração histológica foi considerada com peso diferente de acordo com o impacto que exerce sobre a manutenção da função do órgão. Um índice de alteração histológica hepática foi calculado utilizando a seguinte fórmula (adaptado de SILVA, 2004):

$$\text{IAH} = 10^0 \Sigma(a+b) + 10^1 \Sigma(c+d) + 10^2 (e)$$

Onde:

IAH = índice de alteração histológica

a = congestão

b = desorganização trabecular

c = células inflamatórias

d = degeneração de hepatócitos

e = necrose

Com o resultado do IAH estabeleceu-se o fator de severidade que se relaciona ao aspecto geral do órgão, considerando-se a seguinte pontuação:

- (122 a 128): fígado normal (G1);
- (129 a 158): fígado com alterações discretas (G2);
- (159 a 188): fígado com alterações moderadas (G3);
- (>189): fígado com alterações graves (G4).

Para a análise da proliferação celular utilizou-se o método histoquímico AgNOR modificado (CROCKER E SKILBECK, 1987). Esta análise foi realizada em 38 amostras. Uma das amostras hepáticas não totalizou 200 hepatócitos na contagem dos NORs e por isso não foi incluída na análise. O número de NORs foi contado em um total de 200 hepatócitos com a objetiva de 100x, utilizando registro fotográfico com câmera digital MOTICAM® 2000 2.0 M Pixel USB 2.0. A mensuração da área das NORs foi realizada por meio do programa MOTIC® Images Plus 2.0 M.L.

Para avaliar a proliferação celular e a adesão entre hepatócitos utilizou-se o exame imunohistoquímico com anticorpo anti-Ki-67 e anti-E-caderina, respectivamente. Os cortes histológicos em lâminas previamente silanizadas foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica. Para os cortes submetidos ao anticorpo anti-Ki-67 utilizou-se solução Tris-EDTA pH 9,0 em forno de microondas; para o anticorpo anti-E-caderina utilizou-se solução tampão citrato pH 6,0 em banho-maria. Posteriormente seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena e incubação com os anticorpos primários anti-Ki-67 (clone 7B11, Zymed) ou anti-E-Caderina (clone 4A2C7, Zymed), ambos na diluição de 1:50 em câmara úmida refrigerada por 18 horas. Em seguida, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário (HRP polymer, Zymed) durante 20 minutos em temperatura ambiente e revelação com a solução cromógena DAB® (Zymed). Seguiu-se a contra-coloração com hematoxilina de Harris e montagem da lâmina com resina comercial. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações de acordo com as recomendações do fabricante (epitélio escamoso para E-caderina; carcinoma mamário para Ki-67).

Para a avaliação da proliferação celular foi contado o número de células marcadas com anticorpo anti-Ki-67 em 800 hepatócitos (10 campos) na objetiva de 40x. Para avaliar a marcação com anti-E-caderina, fez-se a avaliação de todo o corte separando-se os animais em dois grupos: marcação forte e homogênea e marcação fraca e heterogênea. A expressão forte e homogênea foi considerada quando a membrana dos hepatócitos em toda a sua extensão apresentava imunoreação ao anticorpo anti-E-caderina.

3.1.2.1 Análise estatística

O teste Exato de Fisher e o teste de Wilcoxon de Mann-Whitney foram utilizados, respectivamente, para avaliar se a intensidade de marcação na E-caderina e o número de células imunoreagentes ao Ki-67 estava associada com o índice de alterações histológicas. O índice de alteração histológica entre os grupos foi avaliado pelo teste de Dunn. Para comparar a proliferação celular do AgNOR nos diferentes grupos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). Considerou-se um nível de significância de 5%.

3.1.3 Resultados

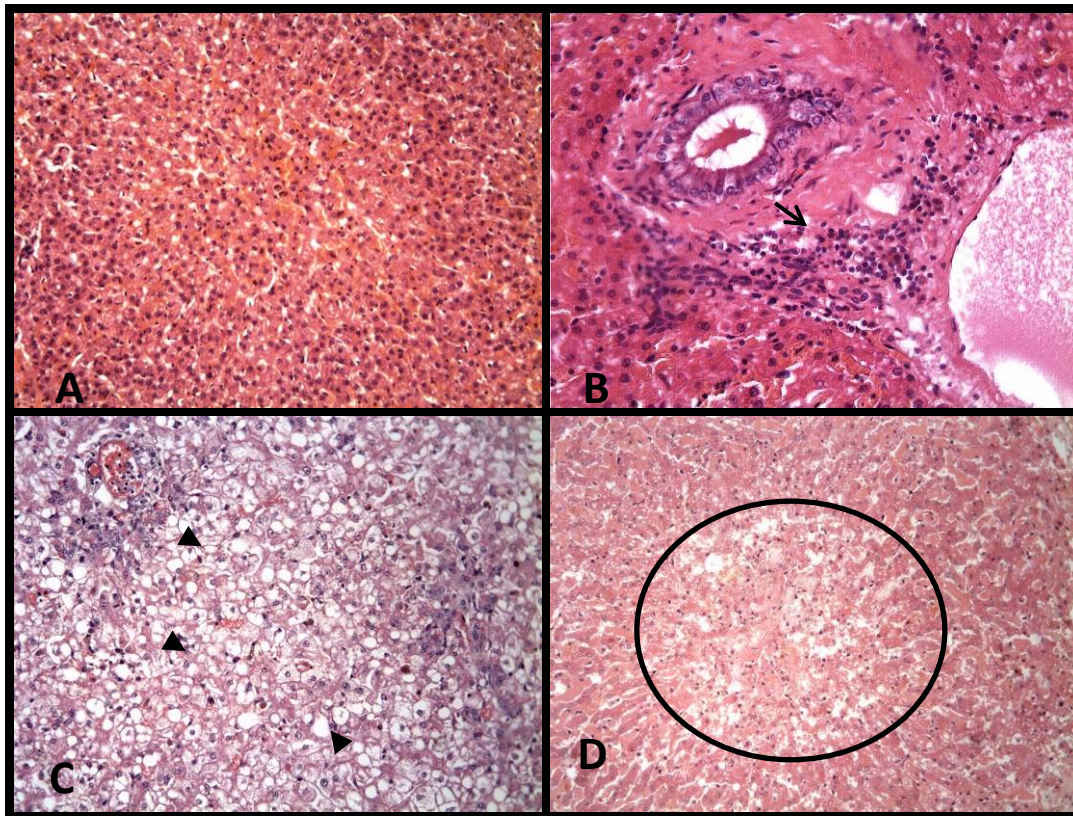
3.1.3.1 Animais

A idade média dos cães utilizados neste estudo foi de 8,3 anos, variando entre três meses a 19 anos. Em relação ao sexo, 19 eram machos (48,7%) e 20 fêmeas (51,3%). Vinte cães eram de raça definida (51,28%), sendo poodle a mais frequente (5/20). As causas primárias que levaram ao óbito estavam relacionadas a hepatopatias em seis animais. Nos demais (33/39), as principais causas de doenças foram neoplasias extra-abdominais e cinomose.

3.1.3.2 Exame histopatológico

Os cortes histológicos foram avaliados e graduados de acordo com um escore lesional que considerou a intensidade das alterações histológicas e sua interferência com a homeostasia hepática. Seis animais não apresentaram alterações histológicas (G1), 10 apresentaram discretas (G2), 10 alterações moderadas (G3) e treze alterações graves (G4). As principais alterações observadas foram infiltrado inflamatório mononuclear, congestão e desorganização trabecular. O número de amostras em cada grupo e a intensidade das alterações estão dispostos na Tabela 1. O índice de alterações histológicas (IAH) foi calculado para cada animal e a média dos grupos foi estabelecida, constatando-se aumento significativo do IAH nos grupos com lesão discreta a grave em relação ao grupo sem alterações (Figura 2).

Figura 1 –Fotomicrografias de tecido hepático de cães. A) Tecido hepático normal (G1). HE. Objetiva de 20x. B) Presença de infiltrado inflamatório moderado periportal (seta), (G2). HE. Objetiva de 40x. C) Degeneração vacuolar grave (cabeças de setas), (G3). HE. Objetiva de 20x. D) Necrose centrolobular (círculo), (G4). HE. Objetiva de 20x. Londrina, 2011.

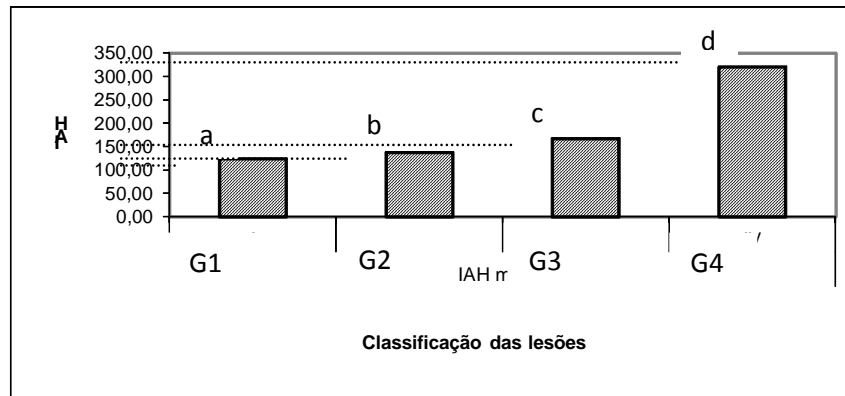


Quadro 1 – Alterações histológicas hepáticas segundo escore de intensidade de lesões presentes nos grupos de cães classificadas pelo HE. Londrina, 2011.

IAH Escore	Escore de intensidade de alterações																			
	Congestão				Infiltrado inflamatório				Desorganização trabecular				Degeneração vacuolar				Necrose			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1- Normal (n=6)	1	3	1	1	4	2			6				6				6			
G2- Alt. discretas (n=10)	1	1	6	2	4	5	1		5	3	2		6	3	1		10			
G3- Alt. moderadas (n=10)	5	1	4		1	3	4	2	2	7	1		4	5	1		10			
G4- Alt. graves (n=13)	4	3	4	2	3	4	6		4	6	3		1	2	5	5	1	5	6	1

Escore de intensidade das alterações: (1) – ausência; (2) – discreta (3) – moderada; (4) – grave.

Figura 2 – Índice de alterações histológicas (IAH) no fígado de cães com diferentes graus de lesão. G1 – fígado sem alterações, G2 – fígado com alterações discretas, G3- fígado com alterações moderadas, G4 – fígado com alterações intensas. Letras diferentes, significância estatística: G1xG2 $p = 3,64E-03$; G1xG3 $p = 1,14E-06$; G1xG4 $p = 4,11E-11$. Londrina, 2011.



3.1.3.3 Exame histoquímico

As NORs de forma geral eram irregulares, sem formato definido e múltiplas, muitas com áreas reduzidas formando pontos ao lado de uma NOR com uma área um pouco maior (Figura 3). Em poucos casos eram regulares formando esferas. O resultado da morfometria das NORs está disposto na Tabela 2. Constatou-se aumento significativo na área das NORs dos grupos com alterações discretas a moderadas em relação ao grupo sem alterações.

Figura 3 –Fotomicrografia de fígado de cão. Observa-se as NORs dos hepatócitos (setas), na maioria deles com dois ou mais pontos impregnados pela prata. AgNOR, objetiva de 100X. Londrina, 2011.

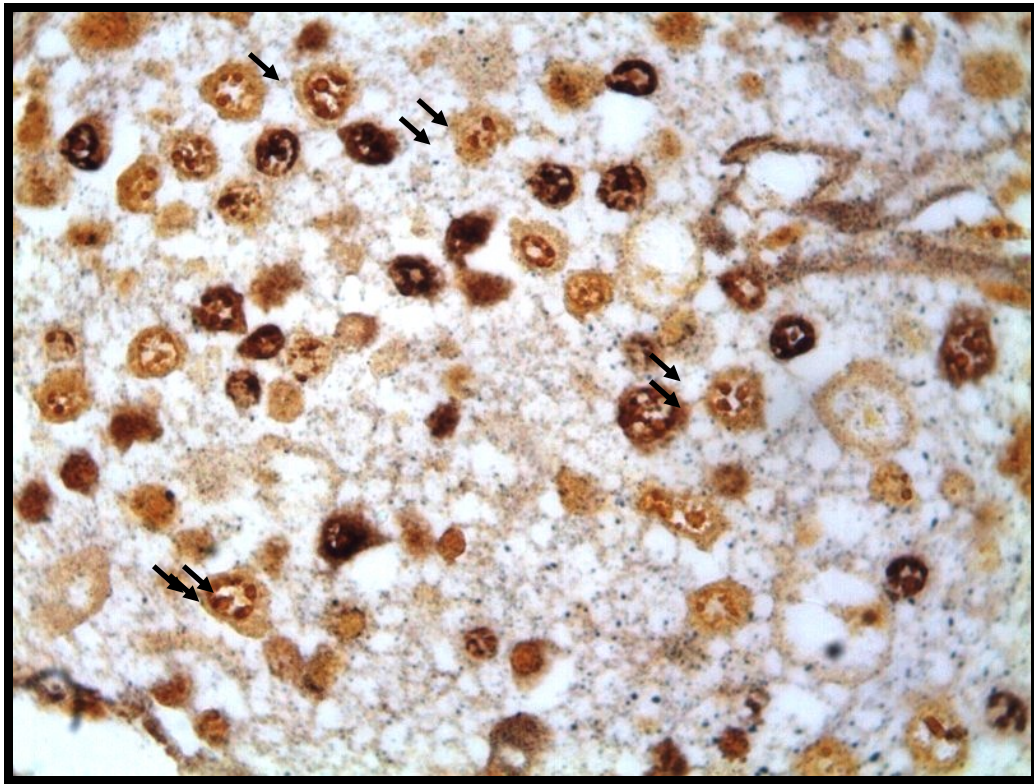


Tabela 1 –Quantificação da proliferação celular no fígado de cães classificados nos grupos 1 a 4, utilizando método histoquímico de AgNOR (valores de médias \pm desvio padrão). Londrina, 2011.

Parâmetro	Valores de média (\pm desvio padrão) de proliferação celular			
	G1	G2	G3	G4
número nors	1,54 \pm 0,75 ^a	1,44 \pm 0,69 ^b	1,27 \pm 0,53 ^c	1,29 \pm 0,60 ^c
área nor/grupo	2,05 \pm 1,02 ^a	2,53 \pm 1,49 ^b	2,23 \pm 1,29 ^c	2,04 \pm 1,10 ^a
média área nor/hepatócito	2,23 \pm 0,93 ^a	2,66 \pm 1,40 ^b	2,37 \pm 1,25 ^c	2,22 \pm 1,05 ^a

Onde: NÚMERO NORs equivale ao número total de NOR por hepatócito no grupo avaliado; ÁREA NOR/GRUPO equivale a área de cada NOR dentro do grupo avaliado; MÉDIA ÁREA NOR/HEPATÓCITO equivale a média das áreas das NOR de cada hepatócito dentro do grupo avaliado. G1: fígado normal; G2 fígado com alterações discretas; G3 alterações moderadas e G4 alterações graves. ANOVA: letras diferentes na mesma linha, significância estatística com $p \leq 0,05$. Número NORs: G1xG2 $p = 0,246E-14$; G1xG3 $p = 0,104E-27$; G1xG4 $p = 0,315E-22$; G2xG3 $p = 0,332E-15$; G2xG4 $p = 0,821E-12$. Área NOR/ grupo: G1xG2 $p = 0,100E-32$; G1xG3 $p = 0,100E-7$; G2xG3 $p = 0,358E-13$; G2xG4 $p = 0,385E-34$; G3xG4 $p = 0,209E-8$. Média área NOR/hepatócito: G1xG2 $p = 0,356E-21$; G1xG3 $p = 0,936E-3$; G2xG3 $p = 0,741E-11$; G2xG4 $p = 0,171E-24$; G3xG4 $p = 0,230E-3$.

3.1.3.4 Exame imunoistoquímico

Para avaliar a proliferação celular utilizou-se a marcação com o anticorpo anti-Ki-67 pelo método imunoistoquímico. O número de células imunoreagentes foi significativamente maior nos grupos com lesão moderada e grave do que nos grupos com lesão discreta ou sem lesão (Figura 4). O número de células imunoreagentes/800 hepatócitos em cada grupo de alterações está apresentado na Figura 5.

Figura 4 –Fotomicrografia de fígado de cão (G4). Observa-se hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 (setas). Imunoistoquímica, objetiva de 40x. Londrina, 2011.

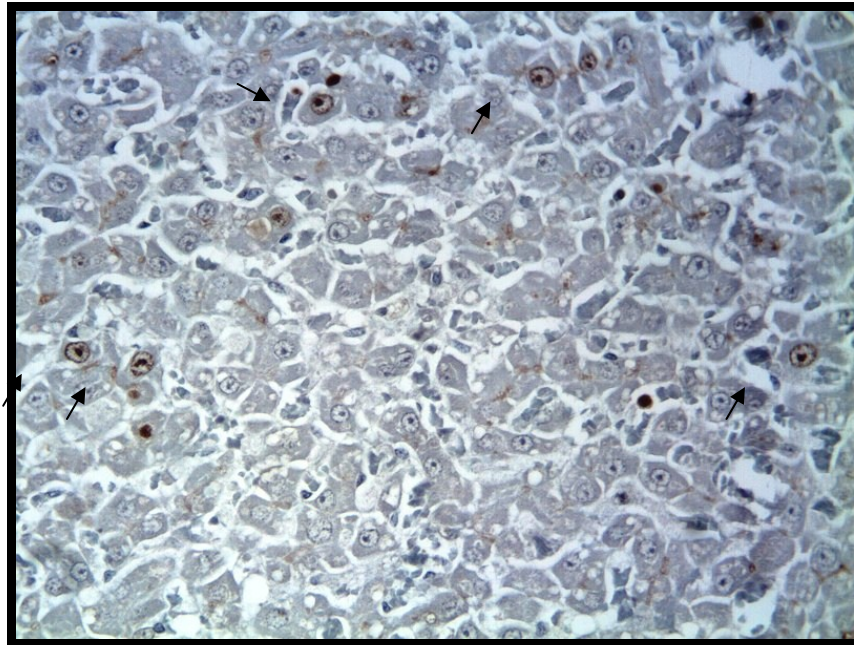
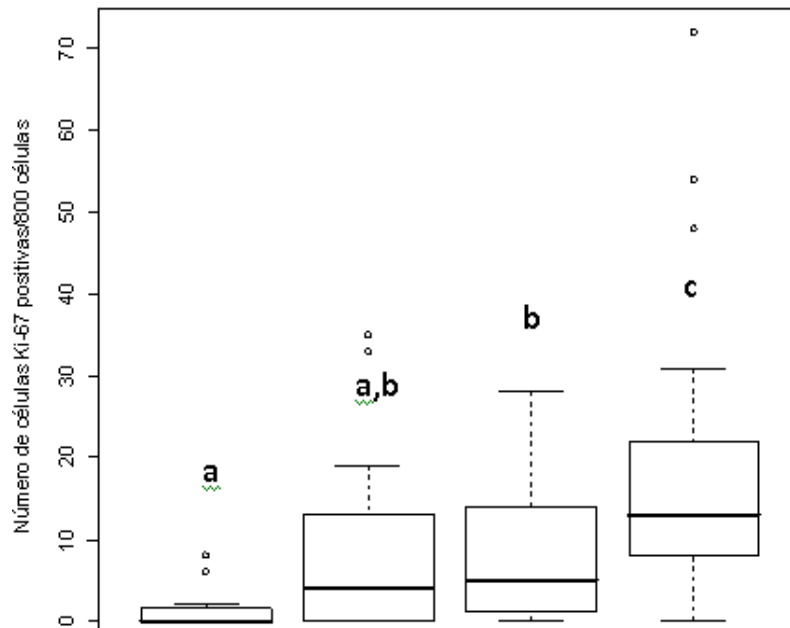


Figura 5 –Número de hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 no exame imunoistoquímico. Londrina, 2011.



1, 2, 3 e 4 correspondem aos grupos classificados histologicamente no HE respectivamente em G1, G2, G3 e G4. Teste de Wilcoxon de Mann-Whitney: letras diferentes equivale a significancia estatística com $p \leq 0,05$, sendo: G1xG3 $p=0,004$; G1xG4 $p=0,000023$; G2xG4 $p=0,02$; G3xG4 $p=0,03$.

A expressão de E-caderina forte e homogênea foi considerada quando a membrana dos hepatócitos em toda a sua extensão apresentava imunoreação ao anticorpo anti-E-caderina (Figura 6A). Expressão fraca e heterogênea foi observada em áreas com predomínio de degeneração vacuolar de hepatócitos (Figura 6B). Não houve diferença significativa entre os grupos na expressão desta proteína (Figura 7).

Figura 6 –Fotomicrografia de fígado de cães. A) Hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-E-caderina com padrão forte e homogêneo. Imunoistoquímica, objetiva de 40x. B) Hepatócitos imunoreagentes com marcação fraca e heterogênea ao anticorpo anti-E-caderina, principalmente na área com degeneração vacuolar (seta). Imunoistoquímica, objetiva de 40x. Londrina, 2011.

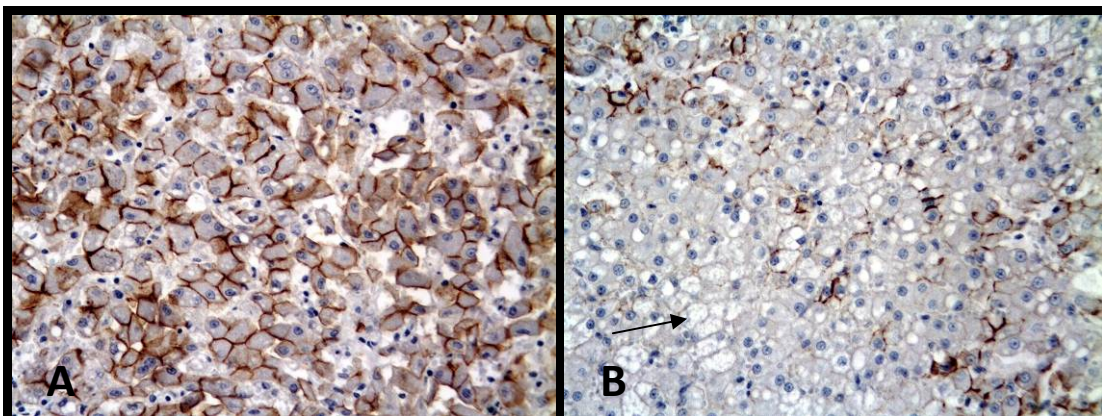
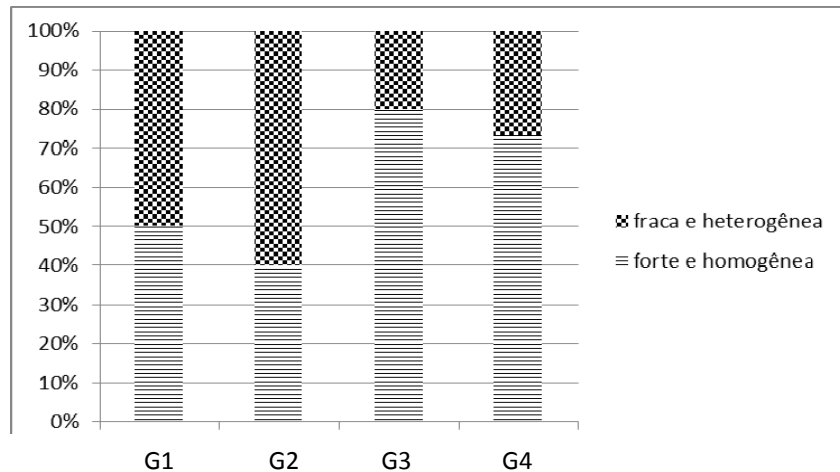


Figura 7 – Demonstração das porcentagens de marcação na imunistoquímica anti-E-caderina em fígado de cães. G1 sem alterações histológicas, G2 alterações histológicas discretas, G3 alterações histológicas moderadas e G4 alterações histológicas graves. Marcação forte e homogênea: G1 50%; G2 40%; G3 80%; G4 73% e marcação fraca e heterogênea: G1 50%; G2 60%; G3 20% e G4 27%. Londrina, 2011.



3.1.4 Discussão

O fígado é o principal órgão responsável pela regulação do metabolismo de nutrientes, xenobióticos e detoxificação, e a conservação da integridade morfológica é essencial para a manutenção da função hepática (INGH et al., 2006). Neste estudo constatamos que 84,6% cães (33/39) apresentavam algum grau de lesão hepática, sendo que clinicamente apenas 15,3% (6/39) dos animais apresentavam doenças hepáticas. Em 32,5% (13/39) dos cães avaliados as lesões foram classificadas como graves, acompanhadas de necrose de hepatócitos e infiltrado inflamatório crônico. As hepatopatias nem sempre são identificadas clinicamente ou por meios laboratoriais. Frequentemente é necessário o diagnóstico histopatológico em biópsias hepáticas que podem não ser representativas da lesão em curso.

A presença de infiltrado inflamatório, com predomínio de células mononucleares, pode ser observada em 85% (34/39) dos cães. A inflamação crônica, independentemente do estímulo que a originou, induz a produção de mediadores químicos. Fatores de crescimento epitelial e angiogênicos são sintetizados e lançados no local para promover o reparo tecidual (VAKKILA e LOTZE, 2004). No entanto, a cronicidade do processo facilita a ocorrência de erros que podem resultar em transformação celular e desenvolvimento de neoplasias. Considerando que aproximadamente 60% (23/39) dos

animais apresentaram lesões moderadas a graves acompanhadas por inflamação crônica, propôs-se a investigar se estas lesões induziam alterações na proliferação de hepatócitos e expressão de E-caderina.

Na análise da proliferação celular por AgNOR, constatou-se redução estatisticamente significativa no número de NORs (Tabela 2), principalmente nos grupos com lesão moderada e grave. Em relação à área, os grupos com lesão discreta e moderada apresentaram aumento significativo em relação ao grupo sem lesão. O aumento no tamanho das NORs foi correlacionado a maior marcação com BrdU, um indicador de proliferação celular, no fígado de ratos (LEEK et al., 1991). Kitano et al. (2000) também constataram que o aumento da área das NORs estava associado ao estabelecimento de focos hepáticos pré-neoplásicos em ratos. Os resultados indicam que lesões discretas e moderadas induzem um aumento na proliferação de hepatócitos. No caso das lesões graves, provavelmente a ocorrência de necrose em 92% (12/13) das amostras afetou os resultados da morfometria, visto que estas células foram contadas próximas à área de necrose onde as células não exibem as NORs satisfatoriamente.

O método imunistoquímico com anticorpo anti-Ki-67 também foi utilizado para avaliar a proliferação celular. Os grupos com lesão hepática moderada e grave apresentaram aumento significativo no número de hepatócitos imunoreagentes em relação aos animais sem lesão, no entanto não houve diferença entre este grupo e o grupo com lesões discretas (Figura 5). Também não se observou diferença entre os grupos de lesões discretas e moderadas. Ao analisarmos apenas os grupos com lesão, constatamos que há uma associação positiva entre o aumento no número de células imunoreagentes e a gravidade das lesões. Há aumento em relação às células imunoreagentes ao Ki-67 no G4 que não se observou na morfometria do AgNOR. Essa diferença, possivelmente, foi em consequência ao número de células avaliadas na imunistoquímica (800) ser quatro vezes maior do que no AgNOR (200), o que possibilitou um distanciamento maior em relação às áreas de necrose e consequentemente a análise de áreas com mais estímulo a proliferação celular. Yoshimoto et al. (1997) relataram que a imunomarcação do Ki-67 é significativamente maior em hepatites crônicas e cirrose quando comparado a fígados normais, assim como em hepatócitos de áreas não neoplásicas de pacientes com carcinoma hepatocelular. Rudi et al. (1995) relataram que a proliferação celular é maior nos estágios iniciais de cirrose biliar primária. No carcinoma hepatocelular, a expressão do Ki-67 apresentou uma relação direta com a taxa de crescimento tumoral (STROESCU et al., 2008).

Alterações nos complexos de adesão celular levam a alterações na polaridade celular, proliferação, motilidade e diferenciação. A redução na expressão da E-caderina devido a mutações foi observada em uma variedade de neoplasias (mamárias, gástricas, hepáticas) associada à perda da inibição por contato e maior potencial de invasão e metástase (TRETIAKOVA et al., 2009). No presente estudo, não foi observada diferença significativa na marcação da E-caderina entre os grupos (Figura 7). A maior parte dos dados disponíveis na literatura relaciona alterações na expressão da E-caderina com neoplasias hepáticas, ainda que eventualmente controversas (ZHAI et al., 2008; ILHARA et al., 1996). Cortes de fígados normais ou com hepatomas apresentam expressão forte e homogênea de E-caderina, enquanto que nos fígados com hepatocarcinoma há uma redução na expressão (TRETIAKOVA et al., 2009). Entretanto, Brunetti e colaboradores (2003) relataram que uma expressão mais intensa da E-caderina pode ocorrer em metástases para o estabelecimento da arquitetura tecidual no novo ambiente de fixação. Assim, podemos supor que a presença de lesões teciduais como a desorganização trabecular e necrose com regeneração mimetiza essa necessidade em se aderir ao “novo” tecido, resultando em uma expressão mais intensa da E-caderina, como observado nos grupos com lesões mais intensas. Na análise das amostras deste estudo pode-se observar claramente que quando há vacuolização citoplasmática com aumento de volume dos hepatócitos, não ocorre a marcação de E-caderina.

Constatamos neste trabalho que alterações histológicas no fígado de cães são freqüentes em animais sem sinais clínicos de hepatopatia. Os principais achados nos fígados com lesão moderada a grave foram infiltrado inflamatório crônico e necrose. As lesões tiveram associação significativa com o aumento da proliferação de hepatócitos, mas não alteraram significativamente a expressão de E-caderina.

3.1.5 Referências

AOKI, K; SAKAMOTO, M; HIROHASHI, S. Nucleolar organizer regions in small nodular lesions representative early stages of human hepatocarcinogenesis. **Cancer**, v.73, n.2, January, p.289-293, 1994.

BORZIO, M; TRERÈ, D; BORZIO, F; FERRARI, AR; BRUNO, S; RONCALLI, M.; COLLOREDO, G; LEANDRO, G; OLIVERI, F; DERENZINI, M. Hepatocyte proliferation rate is a powerful parameter for predicting hepatocellular carcinoma development in liver cirrhosis. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology** v.51, p.96-101, 1998.

BRUNETTI, B; SARLI, G; PREZIOSI, R; LEPROTTI, S; BENAZZI, C. E-cadherin expression. Incidence mammary carcinomas with regional lymph node metastases. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, p.496-500, 2003.

COUSSENS, LM; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, December, p. 860-867, 2002.

CROCKER J., SKILBECK N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. **Journal of Clinical Pathology**, v.40, p.885-889, 1987.

GUO, C.; LIU, Q.G.; YANG, W.; ZHANG, Z.L.; YAO, Y.M. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, n.5, p.490-496, 2008.

ILHARA, A.; KOIZUMI, H.; HASHIZUME, R.; UCHIKOSHI, T.; Expression of epithelial cadherin and alpha- and beta-catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. **Hepatology**, v.23, p.1441-1447, 1996.

INGH, T.S.G.A.M. van den; WINKLE, T.V.; CULLEN, J.M.; CHARLES, J.A.; DESMET, V.H. Morphological classification of parenchymal disorders of canine and feline liver. In: ROTHUIZEN, J.; BUNCH, S.E.; CHARLES, J.A.; CULLEN, J.M.; DESMET, V.J.; SZTMÁRI, V.; TWEDT, D.C.; INGH, T.S.G.A. van den; WINKLE, T.V.; WASHABAU, R.T. **WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases**. Saunders Elsevier, chapter 7, p.85-102, 2006.

KITANO, M; WANIBUCHI, H; MORIMURA, K; SUKATA, T; SHIZUSAWA, M.; FUKUSHIMA, S. Morphological changes in silver-stained nuclear organizer regions (AgNORs) related to proliferative activity in glutathione s-transferase placental form (GST-P) positive foci of rat liver. **Journal of Toxicology Pathology**, v.13, p.261-264, 2000.

KREMER-TAL, S.; NARLA, G.; CHEN, Y.M. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. **Journal Hepatology**, v.46, p.645-654, 2007.

LEEK, R.D.; ALISON, M.R.; SARRAF, C.E. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. **Journal Pathology**, v.165, p.43-51, 1991.

MOHAMET, L.; HAWKINS, K.; WARD, C.M. Loss of function of E-cadherin in embryonic stem cells and the relevance to models of tumorigenesis. **Journal of Oncology**, v.2011, p.1-19, 2010.

ROGERS, A; BOUTIN, S; WHARY, M; SUNDINA, M; GE, Z; CORMIER, K; FOX, J. Progression of chronic hepatitis and preneoplasia in *Helicobacter hepaticus* - infected A/JCr Mice. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n.6, p.668-677, 2004.

RUDI, J. WALDHERR, R.; RAEDSCH, R.; KOMMERELL, B. Hepatocyte proliferation in primary biliary cirrhosis as assessed by proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen labelling. **Journal of Hepatology**, v. 22, p.43-49, 1995.

SILVA, A.G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. 75 f. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Biológicas – área de concentração Zootecnia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SIMECKOVÁ, P.; VONDRÁČEK, J.; PROCHÁZKOVÁ, J.; KOZUBÍK, A.; KRČMÁR, P.; MACHALA, M. 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits beta-catenin-dependent transcription in liver epithelial cells. **Toxicology**, v.16, n.260, p.104-111, 2009.

STROESCU, C.; DRAGNEA, A.; IVANOV, B.; PECHIANU, C.; HERLEA, V.; SGARBURA, O.; POPESCU, A. POPESCU, I. Expression of p53, Bcl-2, VEGF, ki67 and PCNA and prognostic significance in hepatocellular carcinoma. **Journal of Gastrointestinal Liver Disease**, v.17, n.4, p.411-417, 2008.

TRERÈ, D. AgNOR staining and quantification. **Micron**, v. 31, p.127-131, 2000.

TRETIAKOVA, M.S.; HART, J; SHABANI-RAD, M.T.; ZHANG, J.; GAO, Z. Distinction of hepatocellular adenoma from hepatocellular carcinoma with and without cirrhosis using E-cadherin and matrix metalloproteinase immunohistochemistry. **Modern Pathology**, v.22, p.1113–1120, 2009.

YOSHIMOTO, J.; IWATA, T.; TAKAMORI, S.; KOJIMA, K.; FUTAGAWA, S. Usefulness of monoclonal antibody Ki-67 as a prognostic factor of hepatocellular carcinoma. **International Hepatology Communications**, v. 6, p.209-218, 1997.

VAKKILA, J.; LOTZE, M.T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Immunology**, v.4, p.641-648, 2004.

ZHAI, B.; YAN, H.X.; LIU, S.Q.; CHEN, L.; WU, M.C.; WANG, H.Y. Reduced expression. Of E-cadherin/catenin complex in hepatocellular carcinomas. **World Journal Gastroenterology**, v.14, n.37, p.565-5673, 2008.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUÍZ, C.M.; ANDRADE, J.C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.207-215, 2008.

3.2 “ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE *HELICOBACTER* SPP. E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NO FÍGADO DE CÃES”

RESUMO: A infecção da mucosa gástrica por bactérias do gênero *Helicobacter* spp. em seres humanos é importante causa de gastropatias e neoplasias gástricas. Alguns estudos sugeriram a interação entre a infecção por helicobactérias e o desenvolvimento de câncer hepático, biliar e pancreático. No entanto, os fatores envolvidos na colonização do fígado e vias biliares, bem como os mecanismos de patogenicidade destas bactérias ainda são pouco compreendidos. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de alterações histológicas no fígado de cães na presença e ausência de *Helicobacter* spp. com ênfase na proliferação e adesão celular. Amostras hepáticas de 39 cães foram submetidas à avaliação de PCR para o gênero *Helicobacter* spp., ao exame histopatológico para determinação do índice de alteração histológica, à análise da proliferação celular pelo método histoquímico AgNOR e imunoistoquímico anti-Ki-67 e à análise da expressão de E-caderina. Após as análises pelo PCR e histopatologia os animais foram divididos em três grupos: cães PCR negativos e sem alterações histológicas (G1), cães PCR positivos e com alterações histológicas (G2) e cães PCR negativo e com alterações histológicas (G3). O número de animais em cada grupo foi respectivamente, seis, sete e 26. As principais alterações histológicas observadas foram congestão moderada, desorganização trabecular, degeneração vacuolar de hepatócitos, infiltrado inflamatório mononuclear periportal e necrose, sendo a intensidade discreta (10/39), moderada (10/39) e grave (13/39). Constatou-se aumento significativo na área das NORs nos hepatócitos dos animais infectados e com lesão em relação aos não infectados e sem lesão. O número médio de hepatócitos imunoreagentes ao anticorpo anti-Ki-67 foi de 3,0 para o G1, 7,14 para o G2 e 15,35 para o G3. A expressão de E-caderina não diferiu entre os grupos. Os resultados deste estudo sugerem que a presença de *Helicobacter* spp. no fígado de cães propicia um meio inflamatório que pode contribuir com o aumento da proliferação celular e assim modular a carcinogênese hepática.

Palavras-chave: AgNOR. Imunoistoquímica. Ki-67. E-caderina. Proliferação celular

ABSTRACT: The infection of the gastric mucosa by *Helicobacter* spp. in humans is an important cause of stomach diseases and gastric neoplasias. Some studies have suggested the interaction between helicobacter infection and the development of liver, biliary and pancreatic cancer. However, the factors involved in colonization of liver and bile ducts, as well as the mechanisms of pathogenicity of these bacteria are still poorly understood. Thus, this study aimed to evaluate the occurrence of histological lesions in the liver of dogs in the presence and absence of *Helicobacter* spp. with emphasis on proliferation and cell adhesion. Liver samples of 39 dogs underwent evaluation of PCR for the genus *Helicobacter* spp., histopathological exam to determine the rate of histological changes, analysis of cell proliferation by AgNOR histochemical method and anti-Ki-67 immunohistochemistry and expression analysis of E-cadherin. After analysis by PCR and histopathology, the animals were divided into three groups: negative PCR dogs and no histological changes (G1), dogs with positive PCR and histological changes (G2) and dogs with negative PCR and histological changes (G3). The number of animals in each group was respectively six, seven and 26. The main histological changes observed were moderate congestion, trabecular disorganization, vacuolar degeneration of hepatocytes, mononuclear periportal necrosis and, with a mild intensity (10/39), moderate (10/39) and severe (13/39). It was found a significant increase in the NORs in the hepatocytes of infected animals with lesions compared to

uninfected and without injury. The average number of hepatocytes immunoreagents to anti-Ki-67 was 3.0 for G1, 7.14 for G2 and 15.35 for G3. The expression of E-cadherin did not differ between groups. The results of this study suggest that the presence of *Helicobacter* spp. in the liver of dogs provides an inflammatory environment that can contribute to the increased cell proliferation and thereby modulate hepatocarcinogenesis.

Key words: AgNOR. Immunohistochemistry. Ki-67. E-cadherin. Cellular proliferation

3.2.1 Introdução

A infecção por bactérias do gênero *Helicobacter* em seres humanos é considerada como importante causa de gastropatias e neoplasias gástricas (BUCKLEY e O'MORAIN, 1998; MORGNER et al., 2000). O *Helicobacter pylori* é a principal espécie a infectar o homem e sua patogenicidade é atribuída a fatores, como a produção de adesinas e citotoxinas que induzem alterações na proliferação celular e apoptose (GALMICHE et al., 2000; BLASER e ATHERTON, 2004; STABILE et al., 2005). Assim, a infecção bacteriana pode levar a ruptura da barreira da mucosa gástrica e à indução de uma variedade de mediadores inflamatórios (TORRES et al., 2000) que intensificam a apoptose e a renovação celular.

A busca por maiores conhecimentos sobre *Helicobacter* spp. levou ao descobrimento de outras espécies na mucosa gástrica e em outras localizações. A presença de *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. canis*, "*Flexispira rappini*" e *H. pullorum* foi relatada no fígado de seres humanos e animais (FOX et al., 1996, 1998; ITO et al., 2008), sendo associada à cirrose em seres humanos (PELLICANO et al., 2008) e a processos inflamatórios hepatobiliares em ratos (FOX et al., 1996, 1998, GARCIA et al., 2002; ROCHA et al., 2005). Diversos estudos sugeriram a interação entre a infecção por helicobactérias e o desenvolvimento de câncer hepático, biliar e pancreático (LIN et al., 1995; FOX et al., 1998; HUANG et al., 2004; ITO et al., 2008). No entanto, os fatores envolvidos na colonização do fígado e vias biliares, bem como os mecanismos de patogenicidade destas espécies ainda são pouco compreendidos (PRACHASILPCHAI et al., 2007; RECORDATI et al., 2007).

Apesar de tumores hepatobiliares primários serem pouco freqüentes em cães e gatos (THAMM, 2009), a hepatite crônica pode apresentar uma prevalência de 12% em cães (WATSON, 2010). Atualmente a maioria das hepatites primárias é classificada como idiopática (FAVIER, 2009). Fox et al. (1996) isolaram *H. canis* do fígado de um cão com hepatite necrotizante multifocal que inicialmente foi classificada como idiopática. Considerando a prevalência elevada de hepatites crônicas em cães e a possibilidade de

progressão para tumores, a pesquisa de causas para as hepatites classificadas como idiopáticas é necessária para possibilitar o tratamento das mesmas e retardar sua progressão. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de alterações histológicas no fígado de cães na presença e ausência da *Helicobacter* spp. com ênfase na proliferação celular e expressão de E-caderina.

3.2.2 Materiais e Métodos

3.2.2.1 Amostras

Após prévia aprovação pelo comitê de ética, foram selecionados 39 cães, no período de outubro de 2008 a outubro de 2010, pacientes do Hospital Veterinário Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HVU – UEL), que morreram ou foram submetidos à eutanásia devido à doença primária. Foram incluídos apenas os cães cuja necropsia pode ser realizada até 30 minutos após o óbito. Os prontuários dos animais foram examinados posteriormente para determinação do quadro clínico principal.

Os animais foram submetidos à necropsia padrão. O fígado e vesícula biliar foram removidos para análise macroscópica. Foram colhidas quatro amostras de fígado e duas de vesícula biliar de cada animal. Para tanto, a vesícula biliar foi incisada pelo seu eixo maior. Fragmentos de 0,5 cm de diâmetro foram colhidos de pontos equidistantes da vesícula e da região central dos lobos hepáticos. As duas amostras da vesícula e duas de fígado foram destinadas às avaliações moleculares e as outras duas amostras de fígado à análise histológica. As amostras para a reação em cadeia pela polimerase (PCR) foram acondicionadas em microtubos livres de RNase e DNase, e mantidas em freezer a -20°C até o momento do processamento.

3.2.2.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

Na análise molecular, as amostras de fígado e vesícula biliar foram submetidas à digestão enzimática separadamente, utilizando-se 25 μ L de proteinase K (20mg/mL), adicionado de 200 μ L de tampão de lise pH 8 (100 mM de cloreto de sódio, 100 mM de EDTA e 0,5% de dodecil sulfato de sódico), sendo então agitado em aparelho vórtex e incubados em banho-maria a 56°C durante 3 horas. O DNA foi extraído a partir de 500 μ L do material resultante da digestão de acordo com Barreiros et al. (2004).

Para reação de amplificação todas as reações foram preparadas em volume final de 25 μL , sendo 5 μL de mix de DNA (1 μL do DNA extraído, 3,0 μL de água e 1 μL de cada *primer* a 20 pM) e 20 μL do mix da reação contendo 11,75 μL água, 0,4 mM de cada dNTP, 1X tampão de PCR (20 mM Tris –HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,25 U de *Taq platinum* DNA polimerase e 1,5 mM de MgCl_2 (Invitrogen™ Life Technologies, USA).

A seqüência dos *primers* para *Helicobacter* spp. (Gene 16S rRNA) foi (f) 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG CTA 3' e (r) 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA T 3', com produto amplificado de 399 pares de base (GERMANI et al., 1997). Os *primers* foram produzidos pela GIBCO BRL PRODUCTS – Life Technologies do Brasil Ltda. A reação de amplificação foi executada em termociclador modelo PTC-100™ (MJ Reserch INC), com a temperatura de desnaturação de 95°C por cinco minutos, a de anelamento de 65°C e a de extensão de 72°C, com 40 ciclos por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Foi utilizado como controle negativo da extração de DNA a água ultra-pura estéril.

Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2,5% adicionado de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão de TEB pH 8,4 (89 mM Tris HCl, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), submetidos à eletroforese, em voltagem constante 100 V por aproximadamente 40 minutos e visualizado em trans-iluminador sob luz ultravioleta. O registro fotográfico foi realizado utilizando sistema digital Kodak (cúpula Kodak EDAS e KODAK digital câmera DC290 ZOOM – EASTMAN KODAK COMPANY).

3.2.2.3 Exame histopatológico

Os fragmentos hepáticos destinados à avaliação histológica foram fixados em solução de formalina 10% tamponada durante 24 horas, e depois mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico. Seguiu-se a desidratação em série crescente de alcoóis, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Cortes de 5 μm de espessura foram corados pelo método de hematoxilina-eosina. Com o objetivo de quantificar a intensidade das lesões histológicas hepáticas foi estabelecido o seguinte escore:

- (1): ausência de alterações;
- (2): alterações de intensidade discreta (menos de 25% do corte);
- (3): alterações de intensidade moderada (de 25 a 50% do corte);
- (4): alterações de intensidade grave (mais de 50% do corte).

As alterações histológicas avaliadas para compor o escore foram congestão, desorganização trabecular, infiltrado inflamatório, degeneração e necrose. Cada um desses

itens foi classificado de 1 a 4, de acordo com a graduação acima, formando assim um escore lesional para cada alteração. Animais com diagnóstico de neoplasia hepática foram excluídos do estudo.

O peso dado a cada alteração histológica diferiu de acordo com sua importância na manutenção da função do órgão, considerando a seguinte fórmula (adaptado de SILVA, 2004):

$$IAH = 10^0 \Sigma(a+b) + 10^1 \Sigma(c+d) + 10^2 (e)$$

Onde:

IAH = índice de alteração histológica

a = congestão

b = desorganização trabecular

c = células inflamatórias

d = degeneração de hepatócitos

e = necrose

Assim, como o resultado do IAH, estabeleceu-se o fator de gravidade que se relaciona ao aspecto geral do órgão, sendo considerada a seguinte pontuação:

- (122 a 128): fígado normal;
- (129 a 158): fígado com alterações discretas;
- (159 a 188): fígado com alterações moderadas;
- (>189): fígado com alterações graves.

Para a análise da proliferação celular utilizou-se o método histoquímico AgNOR modificado (CROCKER E SKILBECK, 1987). A avaliação foi quantitativa contando-se o número de regiões organizadoras de nucléolos (NORs) em um total de 200 hepatócitos com a objetiva de 100x (AOKI et al., 1994), utilizando registro fotográfico com câmera digital MOTICAM® 2000 2.0 M Pixel USB 2.0, e o programa MOTIC® Images Plus 2.0 M.L. para mensuração da área de cada NOR.

3.2.2.4 Exame imunoistoquímico

Para avaliar a proliferação celular e a adesão entre hepatócitos utilizou-se o exame imunoistoquímico com anticorpo anti-Ki-67 (clone 7B11) e anti-E-caderina (clone 4A2C7), respectivamente. Os cortes histológicos em lâminas previamente silanizadas foram desparafinizados e submetidos à recuperação antigênica. Para os cortes submetidos ao anticorpo anti-Ki-67 utilizou-se solução Tris-EDTA pH 9,0 em forno de micro-ondas; para o

anticorpo anti-E-caderina utilizou-se solução tampão citrato pH 6,0 em banho-maria. Posteriormente seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena e incubação com os anticorpos primários anti-Ki-67 (7B11, Zymed) ou anti-E-Caderina (4A2C7, Zymed), ambos na diluição de 1:50 em câmara úmida refrigerada por 18 horas. Em seguida, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário (HRP polymer, Zymed) durante 20 minutos em temperatura ambiente e revelação com a solução cromógena DAB® (Zymed). Seguiu-se a contra-coloração com hematoxilina de Harris e montagem da lâmina com resina comercial. O número de células marcadas com o anticorpo anti-Ki-67 foi contado em 800 hepatócitos (10 campos) na objetiva de 40x para determinar o número de células marcadas. Para avaliar a marcação com anti-E-caderina, fez-se a avaliação de todo o corte separando-se as amostras em dois grupos: marcação forte e homogênea e marcação fraca e heterogênea. Controles positivos e negativos foram utilizados em todas as reações de acordo com as recomendações do fabricante (epitélio escamoso para E-caderina; carcinoma mamário para Ki-67).

3.2.2.5 Análise estatística

O teste Exato de Fisher e o teste de Wilcoxon de Mann-Whitney foram utilizados para avaliar se a intensidade de células marcadas, respectivamente para anti-E-caderina e anti-Ki-67, estava associada com a presença do *Helicobacter* spp. Na avaliação do índice de alteração histológica foi feito o teste de Dunn. Para comparar a proliferação celular do AgNOR nos cães infectados ou não por *Helicobacter* spp. foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA). Considerou-se o nível de significância estatística de 5%.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Quadro clínico

As causas primárias que levaram ao óbito estavam relacionadas a hepatopatias em seis animais. Nos demais (33/39), as principais causas de doenças foram neoplasias extra-abdominais e cinomose.

3.2.3.2 PCR

Amostras de sete animais, dos 39 avaliados, foram positivas para o gênero *Helicobacter*. Das amostras positivas, quatro eram de fígado, duas de vesícula biliar e uma de ambos os tecidos.

3.2.3.3 Exame histopatológico

As 39 amostras de fígado coradas em HE foram analisadas e graduadas de acordo com o escore lesional. Seis amostras foram classificadas como normais, sendo que as demais apresentavam algum grau de alteração histológica.

As amostras consideradas normais foram também negativas à PCR (n = 6), sendo então utilizadas como grupo controle (G1). Dentre os animais com lesões hepáticas, sete eram positivos à PCR, constituindo desta forma o grupo 2 (G2). Os outros 26 animais foram negativos à PCR e apresentavam alterações histológicas em diferentes graus, formando assim o grupo 3 (G3).

As principais alterações observadas no G2 foram congestão moderada (4/7), desorganização trabecular (6/7), degeneração vacuolar de hepatócitos (4/7), infiltrado inflamatório mononuclear periportal (6/7) e necrose (2/7) (Figura 1). Os valores dos escores de alterações histológicas dos grupos estão apresentados na Figura 2.

Figura 1 –Fotomicrografia de fígado de cão. A) Congestão em toda a área. HE. Objetiva 40x. B) Desorganização trabecular (área delimitada por setas). HE. Objetiva 40x. C) Degeneração vacuolar intensa em hepatócitos (área delimitada por estrelas) e infiltrado inflamatório mononuclear (cabeça de seta). HE. Objetiva 20x. D) Necrose centrolobular (círculo). HE. 40x. Londrina, 2011.

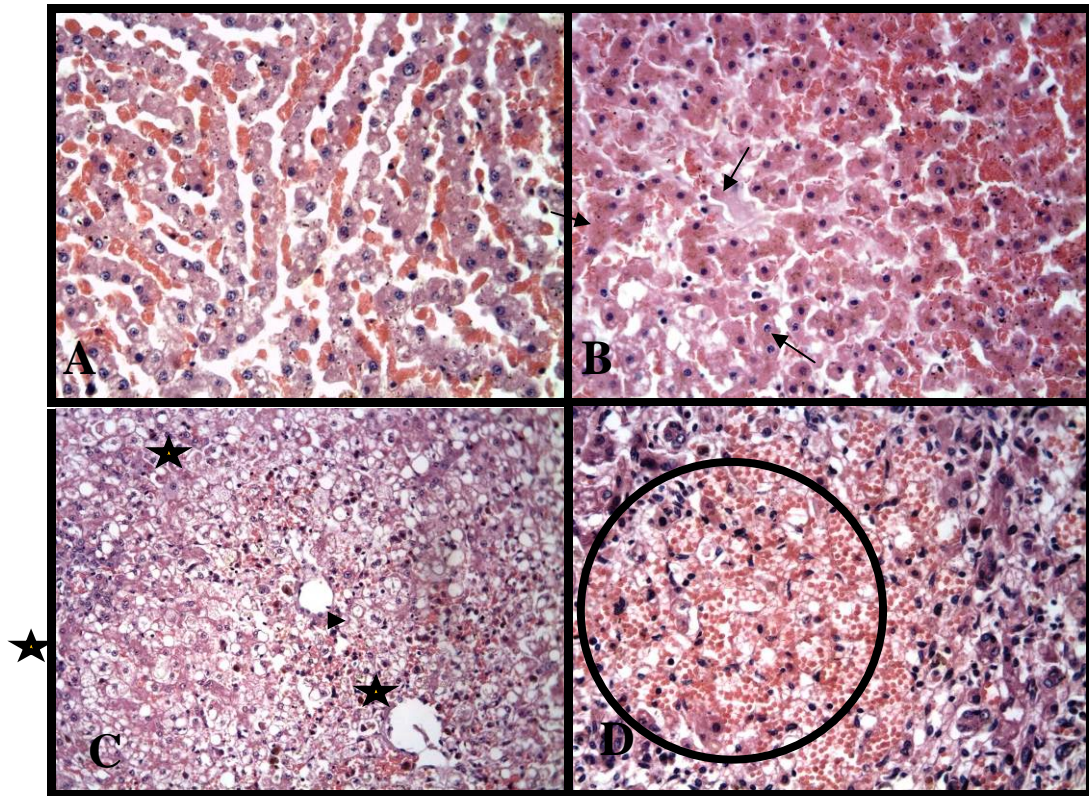
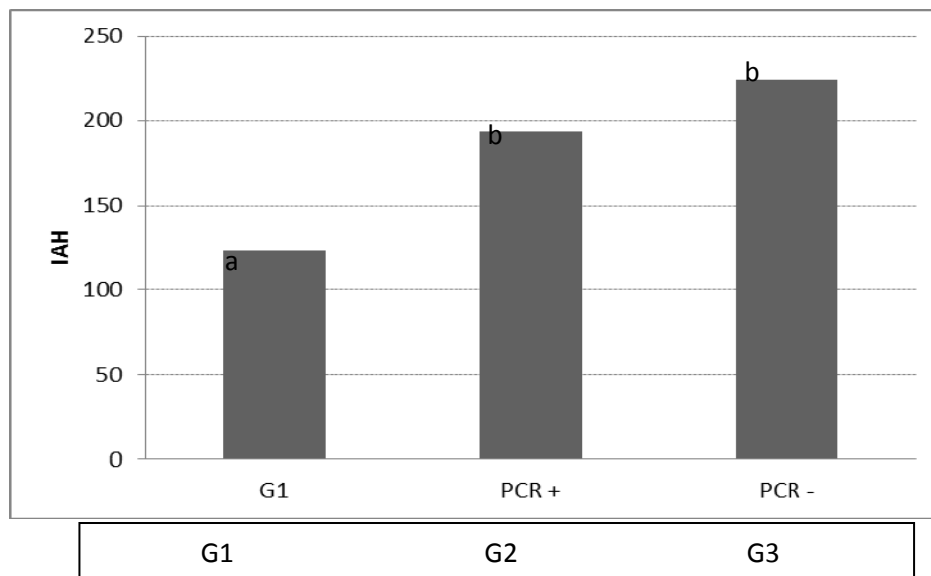


Figura 2 –Média do índice de alterações histológicas hepáticas (IAH) em cães. G1(IAH = 123,5); G2 (IAH = 193,4); G3 (IAH = 227,2). Teste de Dunn: letras diferentes, significância estatística: G1xG2: $p < 0,05$; G1xG3: $p < 0,001$. G1 = grupo não infectado e sem alterações histológicas, G2 = grupo infectado e com alterações histológicas; G3 = grupo não infectado e com alterações histológicas. Londrina, 2011.



3.2.3.4 Exame histoquímico e imunoistoquímico

A morfometria das NORs foi utilizada para avaliar a proliferação de hepatócitos (Figura 3). Os resultados estão apresentados na Tabela 1 em que se observa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todas as variáveis analisadas.

Figura 3 –Fotomicrografia de fígado de cão. Observam-se circundadas as NORs dos hepatócitos e nos quadros, os respectivos perímetros e áreas. AgNOR, objetiva de 100X. Londrina, 2011.

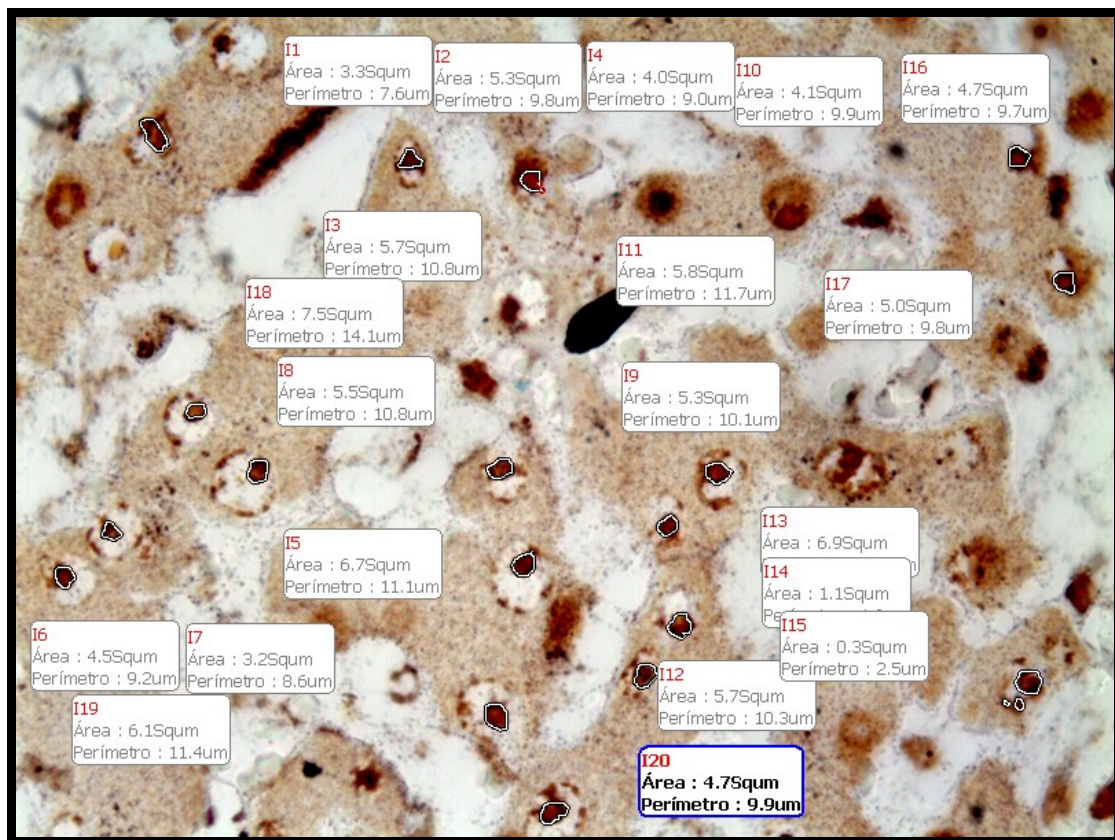


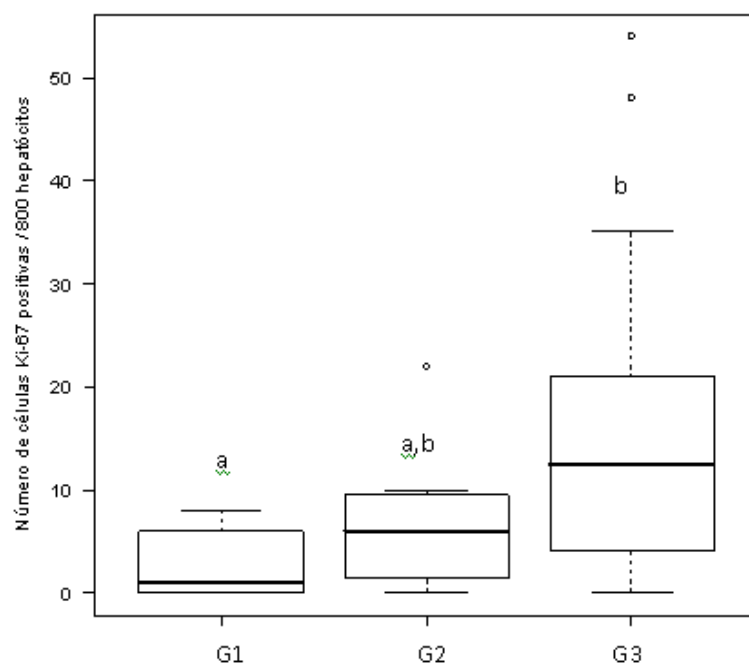
Tabela 1 –Quantificação da proliferação celular (valores de média \pm desvio padrão) no fígado de cães do grupo controle e dos grupos com lesões hepáticas positivo e negativo à PCR para *Helicobacter* spp., respectivamente, utilizando método histoquímico de AgNOR. Londrina, 2011.

Parâmetro	Valores de média (\pm desvio padrão) de proliferação celular		
	G1 (n=6)	G2 (n=7)	G3 (n=26)
número NORs	1,54 \pm 0,75 ^a	1,47 \pm 0,70 ^b	1,27 \pm 0,57 ^c
área NOR/grupo	2,05 \pm 1,02 ^a	2,36 \pm 1,33 ^b	2,17 \pm 1,17 ^c
média área NOR/hepatócito	2,23 \pm 0,93 ^a	2,56 \pm 1,30 ^b	2,32 \pm 1,112 ^c

Onde: número NORs equivale ao número total de NOR por hepatócito no grupo avaliado; área NOR/grupo equivale a área de cada NOR dentro do grupo avaliado; média área NOR/hepatócito equivale a média das áreas das NOR de cada hepatócito dentro do grupo avaliado. G1 = grupo não infectado e sem alterações histológicas, G2 = grupo infectado e com alterações histológicas; G3 = grupo não infectado e com alterações histológicas. Teste ANOVA: letras diferentes na mesma linha, significância estatística com $p \leq 0,05$. Número NORs: G1xG2 $p = 0,115E-1$; G1xG3 $p = 0,259E-38$; G2xG3 $p = 0,637E-25$; Área NOR/grupo: G1xG2 $p = 0,292E-17$; G1xG3 $p = 0,104E-03$; G2xG3 $p = 0,202E-10$; Média área NOR/hepatócito: G1xG2 $p = 0,292E-17$; G1xG3 $p = 0,101E-01$; G2xG3 $p = 0,123E-11$.

O número de hepatócitos imunoreageantes ao anticorpo anti-Ki-67 pelo método imunohistoquímico foi maior nos animais G2 (7,14) em relação ao G1 (3,0), embora a diferença não seja significativa. Já quando se comparou G1 ao G3 (15,35), foi estatisticamente significativo (figura 4).

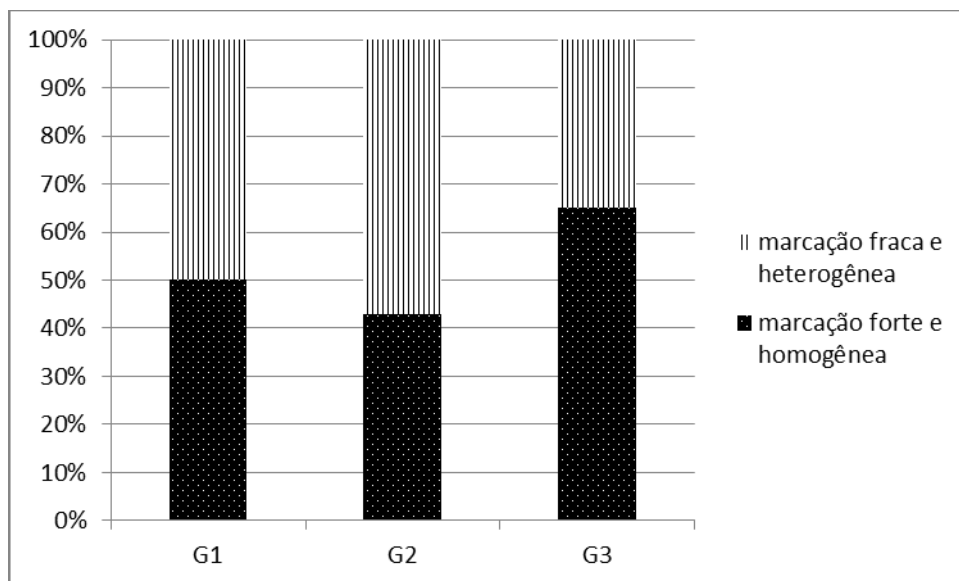
Figura 4 –Número de hepatócitos imunoreageantes ao anticorpo anti-Ki-67 no exame imunohistoquímico. Londrina, 2011.



Teste de Wilcoxon de Mann Whitney. Letras diferentes, significância estatística, com $p \leq 0,05$. G1xG3 $p=0,03$.

A expressão de E-caderina foi considerada forte e homogênea quando a membrana dos hepatócitos em toda a sua extensão apresentava imunoreação ao anticorpo anti-E-caderina. A expressão de E-caderina foi semelhante nos três grupos ($P>0,05$). (Figura 5).

Figura 5 – Demonstração das porcentagens de marcação na imunistoquímica anti-E-caderina em fígado de cães. G1 = grupo não infectado e sem alterações histológicas, G2 = grupo infectado e com alterações histológicas; G3 = grupo não infectado e com alterações histológicas. Teste de Fisher: G1xG2 $p = 1,00$; G1xG3 $p=0,64$; G2xG3 $p = 0,39$. Marcação forte e homogênea: G1 50%; G2 43% e G3 65% e marcação fraca e heterogênea: G1 50%; G2 57% e G3 35%. Londrina, 2011.



3.2.4 Discussão

Neste estudo constatamos por meio da reação em cadeia pela polimerase a presença de *Helicobacter* spp. no fígado e vesícula biliar de cães sem quadro clínico de hepatopatia. Ao contrário das ocorrências elevadas (91 a 94,6%) que são observadas na mucosa gástrica de cães e gatos (EATON et al., 1996; CAMARGO, 2002), no fígado observamos uma ocorrência de 18% (7/39). Em um estudo retrospectivo em seres humanos, constatou-se a presença da bactéria em 4,2% dos pacientes controle, 3,5% dos pacientes com hepatite C não cirrótica, 68% dos pacientes com hepatite C cirrótica e em 61% dos pacientes com carcinoma hepatocelular (ROCHA et al., 2005). Não há dados na literatura sobre frequência de infecção hepática ou biliar por *Helicobacter* spp. em animais, sendo os relatos escassos (FOX et al., 1996; FOX et al., 2002).

Além de determinar a ocorrência de *Helicobacter* spp. no fígado e vias biliares de cães, objetivou-se avaliar a relação entre a presença da bactéria e alterações hepáticas microscópicas. Os cães infectados apresentaram lesões hepáticas como infiltrado de células inflamatórias, degeneração celular e necrose, no entanto, o índice de alterações histológicas não diferiu entre o grupo de animais com lesões hepáticas e não infectados. Apesar de não se poder afirmar que o *Helicobacter* spp. foi o agente causador das lesões, há estudos que relataram lesões em animais infectados. Hepatite necrótica multifocal foi relatada em um cão infectado por *H. canis* (FOX et al., 1996) e em marmotas infectadas por *H. marmotae* sp. nov. (FOX et al., 2002). Em ratos, a inoculação de *H. hepaticus* e *H. bilis* induziu colangite e vasculite que progrediu para hiperplasia de ductos biliares, hiperplasia de células redondas, proliferação hepatocelular, hepatoma ou carcinoma hepatocelular (ITO et al., 2008).

A associação entre a infecção hepática por *Helicobacter* spp. e a indução de cirrose ou neoplasias hepáticas foi demonstrada em diversos estudos (LIN et al., 1995; FOX et al., 1998; HUANG et al., 2004; PELLICANO et al., 2008). Alterações na proliferação celular da mucosa gástrica foram constatadas em seres humanos e animais infectados por *Helicobacter* spp. (De FREITAS et al., 2004, TAKEMURA et al., 2009). Considerando estes estudos, investigou-se também no fígado de cães se a presença de *Helicobacter* spp. estava relacionada à alterações no ciclo celular dos hepatócitos e na adesão entre as células. A morfometria pelo método AgNOR revelou um aumento significativo na área das NORs nos cães infectados, indicando que estes tinham uma atividade transcricional dos hepatócitos maior do que os não infectados com e sem alterações (Tabela 1). No entanto, na análise da proliferação celular com o método de imunistoquímica anti-Ki-67 não se observou diferença entre os animais infectados e não infectados. Kitano et al. (2000), em um estudo sobre marcadores preneoplásicos na hepatocarcinogênese de ratos, relataram que o aumento da área dos NORs reflete a taxa de proliferação celular mais acuradamente que seu número. Na infecção por *H. pylori* o aumento da proliferação celular está relacionada à produção de citotoxinas como a CagA e à indução de mediadores inflamatórios celular que intensificam a renovação celular (BLASER e ATHERTON, 2004; TORRES et al., 2000). Assim, o aumento da atividade da replicação celular maior nos cães positivos à PCR sugere que o *Helicobacter* spp. pode estar envolvido na manutenção de um ambiente inflamatório que cronicamente intensifica o processo transcricional e pode influenciar na hepatocarcinogênese.

As caderinas são proteínas que compõem as junções de adesão celular com importante função na comunicação entre células, na sinalização e diferenciação celular

(SIMECKOVÁ et al., 2009; ZUCCARI et al., 2008). Neste estudo observamos que não houve diferença na expressão da E-caderina entre os hepatócitos dos animais positivos e negativos à PCR (Figura 5). A diminuição na expressão de caderinas tem sido associada a neoplasias malignas com maior potencial de invasão e metástase (GUO et al., 2008). Um estudo *in vitro* demonstrou que a infecção por *H. pylori* CagA positivo induz alterações na expressão de E-caderina e β -catenina que resultam no estímulo a apoptose e proliferação celular compensatória, facilitando a aquisição de mutações nas células epiteliais gástricas (MURATA-KAMIYA et al., 2007). Brunetti et al. (2003) relataram que uma expressão mais intensa da E-caderina pode ocorrer em metástases para o estabelecimento da arquitetura tecidual no novo ambiente de fixação. Assim, podemos supor que a presença de lesões teciduais como a desorganização trabecular mimetiza essa necessidade em se aderir ao “novo” tecido, resultando em uma expressão maior da E-caderina, como observado no G3 (Figura 5).

Vakkila e Lotze (2004) e Rodaski e Pierkarz (2009) apresentaram dados sobre a multiplicidade de mecanismos e vias que possivelmente contribuem para o processo de carcinogênese em infecções crônicas. *Helicobacter* spp. tem sido considerado um fator de risco para cirrose e o carcinoma hepatobiliar, principalmente em humanos já infectados pelo vírus da hepatite C, relatando-se um efeito sinérgico (PELLICANO et al., 2008). À semelhança, observamos que os animais com *Helicobacter* spp. apresentaram alterações histológicas. As diferenças na intensidade das lesões podem ser decorrentes de múltiplos fatores como o tempo da infecção, variações de patogenicidade dentre as espécies infectantes ou ainda a ausência de agentes concomitantes que promovam efeito sinérgico como ocorre em humanos que frequentemente apresentam mais de um agressor hepático, como o vírus da hepatite B, C ou o alcoolismo.

Pouco se conhece sobre as principais espécies de *Helicobacter* que infectam o fígado de hepatopatas devido principalmente a dificuldade em isolar e cultivar estes microrganismos (PELLICANO et al., 2008), o que tem levado ao questionamento se o agente detectado através de biologia molecular é ou não a responsável pelas alterações hepáticas. Dessa forma, ainda hoje a maioria das causas de hepatite primária permanece como de origem idiopática (FAVIER, 2009).

Neste estudo detectamos a presença de material genético de *Helicobacter* spp. no fígado de cães sem quadro clínico de hepatopatia. Observou-se associação significativa entre a presença da bactéria e a ocorrência de alterações histológicas e aumento no potencial proliferativo de hepatócitos. Estes resultados indicam que o *Helicobacter* spp. deve ser considerado dentre as causas de hepatopatia em cães.

3.2.5 Referências

AOKI, K.; SAKAMOTO, M.; HIROHASHI, S. Nucleolar organizer regions in small nodular lesions representative early stages of human hepatocarcinogenesis. **Cancer**, v.73, n.2, January, p.289-293, 1994.

BARREIROS, M.A.; ALFIERI, A.F.; MEDICI, K.C.; LEITE, J.P.; ALFIERI, A.A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.51, p.104-109, 2004.

BLASER, M.J.; ATHERTON, J.C. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.321-333, 2004.

BRUNETTI, B.; SARLI, G.; PREZIOSI, R.; LEPROTTI, S.; BENAZZI, C. E-cadherin expression. In canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, p.496-500, 2003.

BUCKLEY, M. J. M.; O'MORAIN, C. A. *Helicobacter* biology – discovery. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 1, p.7-16, Jan. 1998.

CAMARGO, P.L. Identificação das espécies de *Helicobacter spp.* Presentes na mucosa gástrica de cães, gatos e seres humanos, e sua correlação com as alterações da mucosa. 112 f. Tese de doutorado. Clínica Médica – Clínica Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

CROCKER J., SKILBECK N. Nucleolar organizer region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. **Journal of Clinical Pathology**, v.40, p.885-889, 1987.

DE FREITAS, D.; URBANO, M.; GOULAO, M.H.; DONATO, M.M.; BALDAIA, C.; MARTINS, M.I.; SOUTO, P.; GREGORITO, C.; FIGUEIREDO, P.; GOUVEIA, H.; ROMAOZINHO, J.M. The effects of *Helicobacter pylori* infection on apoptosis and cell proliferation in gastric epithelium. **Hepatogastroenterology**, v.51, p.876-882, 2004.

EATON, K.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; TZELLAS, N.; COLEMAN, B.E.; PAOLA, J.; SHERDING, R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.3165-3170, 1996.

FAVIER, R.P. Idiopathic hepatitis and cirrhosis in dogs. **Veterinary Clinical Small Animal**, v. 39, p.481-488, 2009.

FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; SHEN, Z.; TAYLOR, S.; PASTER, B.J.; ERICSON, R.L.; LAU, C.N.; CORREA, P.; ARAYA, J.C.; ROA, I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. **Gastroenterology**, v.114, n.4, p.55-763, 1998.

FOX, J.G.; SHEN, Z.; SHILU, X.; FENG, Y.; DANGLER, C.A.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; CULLEN, J.M. *Helicobacter marmotae* sp. nov. isolated from livers of woodchucks and intestines of cats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2513-2519, 2002.

FOX, J.G.; DROLET, R.; HIGGINS, R.; MESSIER, S.; YAN, L.; COLEMAN, B.E.; PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E. *Helicobacter canis* Isolated from a Dog Liver with Multifocal necrotizing Hepatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n.10, Oct., p. 2479-2482, 1996.

GALMICHE, A.; RASSOW, J.; DOYE, A.; CAGNOL, S.; CHAMBARD, J.C.; CONTAMIN, S.; De THILLOT, V.; JUST, I.; RICCI, V.; SOLCIA, E.; VAN OBBERGHEN, E.; BOQUET, P. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. **The EMBO Journal**, v.19, p.6361-6370, 2000.

GARCÍA, A.; ERDMAN, S.E.; XU, S.; FENG, Y.; ROGERS, A.B.; SCHRENZEL, M.D.; MURPHY, J.C.; FOX, J.G. Hepatobiliary inflammation, neoplasia, and argyrophilic bacteria in a Ferret colony. **Veterinary Pathology**, v.39, p.173-179, 2002.

GERMANI, Y.; DAUGA, C.; DUVAL, P.; HUERRE, M.; LEVY, M.; PIALOUX, G.; SANSONETTI, P.; GRIMONT, P. A. D. Strategy for the detection of helicobacter species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy. **Research in Microbiology**, v.148, p.315-326, 1997.

GUO, C.; LIU, Q.G.; YANG, W.; ZHANG, Z.L.; YAO, Y.M. Relation among p130Cas, E-cadherin and beta-catenin expression, clinicopathologic significance and prognosis in human hepatocellular carcinoma. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.7, n.5, p.490-496, 2008.

HUANG, Y.; FAN, X.G.; WANG, Z.M.; ZHOU, J.H.; TIAN, X.F.; LI, N. Identification of helicobacter species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v.57, n.12, p.1273-1277, 2004.

ITO, K.; YAMAOKA, Y.; OTA, H.; EL-ZIMAITY, H.; GRAHAM, D.Y. Adherence, Internalization, and Persistence of *Helicobacter pylori* in Hepatocytes. **Digestive Disease Science**, v. 53, p. 2541-2549, 2008.

KITANO, M.; WANIBUCHI, H.; MORIMURA, K.; SUKATA, T.; SHIZUSAWA, M.; FUKUSHIMA, S. Morphological Changes in Silver-stained Nuclear Organizer Regions (AgNORs) Related to Proliferative Activity in Glutathione S-transferase Placental Form (GST-P) Positive Foci of Rat Liver. **Journal of Toxicology Pathology**, v.13, p.261-264, 2000.

LIN, T-T; YEH, C-T; WU, C-S; LIAW, Y-F. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. **Digestive Diseases and Sciences**, v.40, n.10, p.2214-2219, 1995.

MORGNER, A.; LEHN, N.; ANDERSEN, L. P.; THIEDE, C.; MADSEN, B.; BENNEDSEN, M.; TREBESIUS, K.; NEUBAUER, B.; NEUBAUER, A.; STOLTE, M.; BAYERDÖRFFER, E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. **Gastroenterology**, v.118, p.821-828, 2000.

MURATA-KAMIYA, n.; KURASHIMA, Y.; TEISHIKATA, Y.; YAMAHASHI, Y.; SAITO, Y.; HIGASHI, H.; ABURATANI, H.; AKIYAMA, T.; PEEK JR, R.M.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the b-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. **Oncogene**, v.26, p.4617-4626, 2007.

PELLICANO, R.; MÉNARD, A.; RIZZETTO, M.; MÉGRAUD, F. Helicobacter species and liver diseases: association or causation? **The Lancet Infectious Diseases**, v.8, n.4, p.254-260, 2008.

PRACHASILPCHAI, W; NUANUALSUWAN, S; CHATSUWAN, T; TECHANGAMSUWAN, S; WANGNAITHAM, S AND SAILASUTA, A. Diagnosis of *Helicobacter* spp. Infection in canine stomach. **Journal Veterinary Science**, v.8, p.139-145, 2007.

RECORDATI, C.; GUALDI, V.; TOSI, S.; FACCHINI, R.V.; PENGO, G.; LUINI, M.; SIMPSON, K.W.; SCANZIANI, E. Detection of *Helicobacter* spp. DNA in the oral cavity of dogs. **Veterinary Microbiology**, v.199, n.2-4, p.346-351, 2007.

ROCHA, M.; AVENAUD, P.; MÉNARD, A.; Le BAIL, B; BALAUD, C; BIOULAC-SAGE, P.; MAGALHÃES, D.M.; MÉGRAUD, F. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. **Gut**, v.54, p.396-401, 2005.

RODASKI, S; PIERKARZ, CH. Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: DALECK, CR; DE NARDI, AB; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. Rocca, cap. 1, PP.1-23, 2009.

SILVA, A.G. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. 75 f. **Dissertação de Mestrado**. Ciências Biológicas – área de concentração Zoologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SIMECKOVÁ, P.; VONDRÁČEK, J.; PROCHÁZKOVÁ, J.; KOZUBÍK, A.; KRČMÁR, P.; MACHALA, M. 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits beta-catenin-dependent transcription in liver epithelial cells. **Toxicology**, v.16, n.260, p.104-111, 2009.

STABILE, B.E.; SMITH, B.R.; WEEKS, D.L. *Helicobacter pylori* infection and surgical disease – Part I. **Current Problems in Surgery**, v.42, p.756-789, 2005.

TAKEMURA, L. S. ; CAMARGO, P. L. ; ALFIERI, A. A. ; BRACARENSE, A. P. F.R.L. . *Helicobacter* spp. in Cats: Association between Infecting Species and Epithelial Proliferation within the Gastric Lamina Propria. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, p. 127-134, 2009.

THAMM, D.H. Neoplasias Hepáticas. In: DALECK, CR; DE NARDI, AB; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. Rocca, cap. 20, p.329-334, 2009.

TORRES, J.; PEREZ-PEREZ, G.; GOODMAN, K.J.; ATHERTON, J.C.; GOLD, B.D.; HARRIS, P.R.; IA GARZA, A.M.; GUARNER, J.; MUNOZ, O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research**, v.31, p.431-469, 2000.

VAKKILA, J.; LOTZE, M.T. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Immunology**, v.4, p.641-648, 2004.

WATSON, P.J.; ROULOIS, A.J.; SCASE, T.J.; IRVINE, R.; HERRTAGE, M.E. Prevalence of hepatic lesions at post-mortem examination in dogs and association with pancreatitis. **Journal of Small Animal Practice**, v.51, n.11, p.566-572, 2010.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; TERZIAN, A.C.B.; PEREIRA, R.S.; RUÍZ, C.M.; ANDRADE, J.C. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.4, p.207-215, 2008.

CONCLUSÕES

- ◆ Alterações histológicas no fígado de cães são frequentes mesmo em animais sem sinais clínicos de hepatopatia.
- ◆ *Helicobacter* spp. pode ser encontrado no fígado e vesícula biliar de cães sem sinais clínicos de hepatopatias.
- ◆ A presença da *Helicobacter* spp. no fígado de cães altera a transcrição celular, podendo cronicamente, contribuir na hepatocarcinogênese.
- ◆ *Helicobacter* spp. deve ser considerado dentre as causas de hepatopatia em cães.
- ◆ A vacuolização citoplasmática de hepatócitos altera a expressão da E-caderina.

ANEXOS

ANEXO A:
LISTA DE REAGENTES E PRODUTOS

1. 2-Mercaptoetanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka[®])
2. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
3. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
4. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
5. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen[®])
6. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
7. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
8. Ácido fórmico P.A. / ACS (Reatec[®])
9. Agarose (Gibco BRL[®])
10. Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
11. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (Synth[®])
12. Anticorpos (E-caderina e Ki-67) (Zymed[®])
13. Azul de bromofenol (Sigma[®])
14. Bicarbonato de sódio P.A. ($NaHCO_3$) P.M. 84,01 (Biotec[®])
15. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
16. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
17. Clorofórmio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
18. DAB (Invitrogen Life Technologies[™])
19. Didithiothreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies[™])
20. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
21. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μ L; 25 μ mol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
22. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth[®])
23. EDTA
24. Eosina (Nuclear[®])
25. Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
26. Formaldeído P.A. (Vetec[®])
27. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])

28. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
29. Gelatina U.S.P. (Sinth[®])
30. Glicina, P.A. (Nuclear[®])
31. Glicose
32. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
33. Hidroquinona (Nuclear[®])
34. Hematoxilina (Nuclear[®])
35. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
36. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
37. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
38. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/ μL (Invitrogen Life Technologies[®])
39. Nitrato de Prata (Sinth[®])
40. PCR-buffer (10X) (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[®])
41. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[®])
42. Proteinase K (Invitrogen Life Technologies[™])
43. RT-Buffer (5X) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl_2 , 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
44. Sacarose, P.A. – sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen[®])
45. Silicon dioxide (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
46. TripLE[™] Express Stable Trypsin-like Enzyme (Gibco[®])
47. Triton X-100 (Synth[®])
48. Tris (Nuclear[®])
49. Xileno P.A. (Nuclear[®])

ANEXO B

SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **PBS pH 7,2**
 - Misturar 1,98 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 500 mL de água MilliQ[®]
 - Acrescentar 0,36 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 8.17 g de NaCl
 - Adicionar água MilliQ[®] q.s.p. 1.000 mL
 - Ajustar solução para pH 7,2

- **Triton X -100 a 0.5%**
 - Acrescentar 0,5 mL de Triton X -100 em 99,5 mL de PBS

- **Solução A – Solução Colóide (Técnica de AgNOR)**
 - Aquecer 50 mL de água deionizada a 60°C
 - Dissolver 1 g de gelatina
 - Quando solução à temperatura ambiente, adicionar 0,5 mL de ácido fórmico

- **Solução B – Solução de Prata (Técnica de AgNOR)**
 - Dissolver 50 g de nitrato de prata em 100 mL de água destilada

- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ[®] autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Adicionar 600 μL de HCl (32% w/v) para ajustar pH para 2,0
 - Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton x 100

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de Amostra**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 24 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

- **Tampão citrato pH 6,0**
 - 2,1 g de ácido cítrico H₃C₆H₅O₇·H₂O
 - 1000 mL de Água destilada

- **Tampão Tris-EDTA Tween20 pH 9,0**
 - 1,211 g de TRIS
 - 0,372 g de EDTA
 - 1000 mL de Água destilada
 - 0,2 mL de Tween20

ANEXO C

PROTOCOLO DE TÉCNICAS

- **AgNOR**

- Desparafinizar a lâmina à temperatura de 80°C
- Reidratar a partir de xilol a álcool 70° GL
- Descanso em água destilada por 10 min
- Colocar em imersão na solução de Triton X 100 a 0.5% por 15 min
- Lavar em água corrente por 20 min
- Colocar a lâmina invertida no laminário
- Preparar solução de A+B na proporção de 1A:2B
- Para cada lâmina, 3 mL da solução A+B
- Estufa a 37°C por 25 min
- Lavar em água corrente por 20 min
- Secar e montar

- **Extração do DNA**

- Acrescentar 250 µL de água estéril em cada amostra de biópsia gástrica
- Adicionar 250 µL de solução TENP
- Misturar em vórtex
- Agitar por 10 min
- Acrescentar 50 µL de SDS 10% e 25 µL de Proteinase K
- Misturar em vórtex
- Banho-maria à 56°C durante 2 h
- Agitar em vórtex
- Adicionar 500 µL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
- Banho-maria à 56°C durante 15 min
- Centrifugar a 10.000 g durante 10 min
- Recolher sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar 500 µL de solução L6
- Adicionar 30 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar durante 30 min em temperatura ambiente

- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Repetir 1 vez os quatro últimos passos
- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante
- Repetir 1 vez os quatro últimos passos
- Adicionar 1 mL de acetona P.A.
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60° C durante 2 min
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria à 56° C durante 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 2 min
- Recolher sobrenadante em microtubos de 500 µL
- Estocar a -20°C

- **Primers**

Helicobacter spp. (forward): 5' AAC GAT GAA GCT TCT AGC TTG
CTA 3'

Helicobacter spp. (reverse): 5' GTG CTT ATT CST NAG ATA CCG TCA
T 3'

Fragmentos: Gênero *Helicobacter* 399 pb

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 2,5 µL

MgCl₂ (50 mM): 1,5 µL

dNTP (0,1 mM): 4,0 µL

primer forward (20 pmol): 0,5 µL

primer reverse (20 pmol): 0,5 µL

Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (5 U/µL): 0,25 µL

Água estéril q.s.p. 24 µL

Amotra: 1 µL

- **PCR**

- Gênero *Helicobacter*: ciclo inicial de desnaturação de 95°C por 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C (desnaturação), 65°C (anelamento) e 72°C (extensão), ciclo de extensão final de 72°C por 10 min, repouso a 4°C.

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4

- 30 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

Amostra: 7,0 µL do *amplicom* e 3,0 µL tampão de amostra

Corrida por aproximadamente 45 minutos a 100 V e 80 A

Visualização em transiluminador de luz ultravioleta

- **Imunoistoquímica (E-caderina e Ki-67)**

- Xilol 1 – 20min (em estufa)

- Xilol 2 – 15min

- Álcool abs. 1 – 10min

- Álcool abs. 2 – 10min

- Álcool 90% 1 – 5 min

- Álcool 90% 2 – 5min

- Álcool 80% 1 – 5min

- Álcool 80% 2 – 5min

- Álcool 70% 1 – 5min

- Álcool 70% 2 – 5min

- Lavar em água corrente por 10min.

- Enxaguar duas vezes em água destilada.

- Recuperação Antigênica

- Para E-caderina: Colocar as lâminas em recipiente metálico com solução tampão citrato pH 6,0 e por em banho –maria (placa aquecedora) por 35 minutos após iniciar formação de bolhas. Ir controlando temperatura manualmente para não permitir fervura. Deixar esfriar em temperatura ambiente, na solução tampão citrato pH 6,0, por 1 a 2 horas.

- Para Ki-67: Colocar as lâminas em recipiente plástico com solução tampão Tris – EDTA pH 9,0 e por micro-ondas por 9 minutos, devendo sempre interromper quando iniciar a formação de bolhas. Após, deixar esfriar em temperatura ambiente, na solução tampão Tris-EDTA pH 9,0, por 1 a 2 horas.

- Lavar em água corrente por 10min.

- Enxaguar duas vezes em água destilada.

- Colocar as lâminas em solução de metanol (140ml) + água oxigenada 20volumes (10ml). Deixar em câmara escura por 20 minutos.

- Lavar em água corrente por 10 minutos.

- Enxaguar duas vezes em água destilada.

- Secar as lâminas individualmente com papel absorvente e colocar uma gota de anticorpo primário (E-caderina ou Ki-67) cobrindo todo o corte.

- Incubar em câmara úmida, deixando em geladeira por 18 horas.

- Lavar as lâminas com solução PBS pH 7,2 por 5min (repetir duas vezes).

- Secar as lâminas individualmente e colocar uma gota do anticorpo secundário, cobrindo todo o corte. Cobrir e deixar incubando em temperatura ambiente por 20min.

- Lavar as lâminas com solução de PBS pH 7,2 por 5min (repetir duas vezes).

- Cobrir o corte com o DAB e observar revelação.

- Lavar as lâminas em água corrente por 10min.

- Enxaguar duas vezes com água destilada.

- Contra-corar com hematoxilina (20 segundos).

- Lavar em água corrente por 10min.

- Enxaguar em água destilada duas vezes.

- Álcool 70% - 5min.
- Álcool 80% - 5min
- Alcool 90% - 5min.
- Álcool 100% - 10min.
- Xilol - 15min.
- Montagem das lâminas.