

Fernanda Aurora Gomes de Seixas

NEOPLASIAS UROTELIAIS BOVINAS

Contributo para a sua caracterização Biopatológica

Mestrado em Oncologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Abel Salazar
Universidade do Porto
1996/98



UNIVERSIDADE DO PORTO



Jefferson
Medical
College

Neoplasias Uroteliais Bovinas
Contributo para a sua caracterização biopatológica

FERNANDA AURORA GOMES DE SEIXAS

Porto, 1999

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE
MESTRE APRESENTADA AO INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR DA
UNIVERSIDADE DO PORTO

A meus pais e ao Paulo

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Lopes, exprimimos a nossa gratidão pela disponibilidade na orientação científica deste trabalho, pelos ensinamentos que nos transmitiu e facilidades concedidas na execução de técnicas existentes no Laboratório de Anatomia Patológica do IPO-Porto.

Ao Professor Doutor Fernando Oliveira Torres, coordenador do mestrado em Oncologia, exprimimos o nosso reconhecimento pelos sábios conhecimentos que nos transmitiu e por nos fazer ver a Oncologia numa perspectiva nova e inovadora.

Ao Professor Doutor Guimarães dos Santos agradecemos a forma dinâmica como coordena este mestrado.

Ao Dr. Carlos Palmeira não podia deixar de reconhecer a simpatia com que nos recebeu, a colaboração prestada na realização da técnica de Citometria de Imagem e análise estatística dos dados, sugestões sempre pertinentes e incentivo na realização deste trabalho

A todos os elementos do Serviço de Anatomia Patológica e Serviço de Biologia Molecular do IPO-Porto, agradecemos a simpatia com que nos acolheram. Um agradecimento especial à D. Angela e D. Paula por toda a disponibilidade demonstrada e esclarecimentos prestados na realização das técnicas de histoquímica e imunocitoquímica, e à D. Fernanda pelas palavras de incentivo e amizade.

Não podemos deixar de exprimir a nossa gratidão à Dra. Teresina, Dr. Eduardo e Dr. Rui Henriques pela disponibilidade sempre demonstrada e esclarecimentos científicos prestados.

À Dra. Maria José Bento agradecemos a preciosa colaboração no tratamento estatístico dos dados.

À UTAD agradecemos a autorização para a frequência deste mestrado e meios concedidos que possibilitaram a realização da componente prática deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Potes, coordenador da Secção de Patologia e Clínicas Veterinárias até Setembro de 1998, agradecemos a boa vontade com que disponibilizou os meios necessários à frequência deste mestrado.

À professora Doutora Maria dos Anjos Pires, responsável pelo Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, agradeço as facilidades concedidas na flexibilidade de horário de docência, todas as preciosas sugestões e amizade com que nos distinguiu.

Não podemos deixar de exprimir o nosso reconhecimento às amigas e colegas de mestrado, Isabel e Luísa, pelas sugestões e auxílio na elaboração deste trabalho, apoio incondicional, compreensão e paciência nos momentos de incerteza.

À D. Beatriz, com saudade, agradeço o exemplo de vida e abnegação.

Às minhas colegas Dras Anabela Alves, Paula Rodrigues, Justina Prada, Maria de Lurdes Pinto e Adelina Gama agradecemos a colaboração e amizade com que nos distinguiram.

Às funcionárias do Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD, D. Lígia Lourenço e D. Ana Plácido agradecemos toda a colaboração prestada.

Ao Dr. Pedro Roquete agradecemos a disponibilização de algum material utilizado nas técnicas de histoquímica e imunocitoquímica.

À nossa família e amigos agradecemos o carinho e paciência nos momentos de ausência.

A todos quanto contribuíram para a realização deste trabalho, o nosso muito obrigado.

RESUMO

As neoplasias vesicais são raras em todos os animais domésticos, mas consideradas comuns em bovinos em algumas regiões do mundo, associadas ao síndrome Hematúria Enzótica.

Em Medicina Veterinária, a Oncologia é uma área em emergência e pouco se conhece acerca da etiopatogenia e caracterização patológica das doenças neoplásicas. Com este estudo pretendemos caracterizar as neoplasias uroteliais bovinas efectuando simultaneamente uma revisão crítica da classificação destas neoplasias. Realizámos uma caracterização morfológica recorrendo a técnicas de coloração e histoquímica (H&E, PAS-Azul Alciano, Orceina), de imunohistoquímica (antígeno Ki-67, CEA, Caderina E, CD44 e CD44_{v6}, p53 e p21^{ras}) e estudo da ploidia de ADN por Citometria de Imagem. Foram analisadas 55 neoplasias primárias de bexiga dos seguintes tipos histológicos: neoplasias transicionais (n=47), carcinomas de padrão bifásico (n=5), adenocarcinomas (n=2) e carcinomas indiferenciados (n=1).

Nas neoplasias transicionais, todas de carácter maligno, observámos uma grande heterogeneidade de padrões arquitecturais, de atipia citológica e de agressividade biológica. Encontrámos uma elevada fracção de carcinomas de padrão papilar invertido e extensas áreas de diferenciação glandular. Na análise univariada observámos associação entre o grau nuclear e o padrão arquitectural (papilar vs nodular), o comportamento invasor, os índices de proliferação celular e a imuno-expressão de vimentina. A imunorreactividade ao CEA ocorreu principalmente no grupo dos carcinomas de alto grau, o que pode estar associado a menor diferenciação celular neste grupo neoplásico. A expressão de Caderina E foi heterogénea em todas as neoplasias e mesmo no urotélio não neoplásico. Encontrámos também associação entre os parâmetros patológicos clássicos e as variáveis citométricas (Ploidia de ADN, Índice de ADN e fracção de células >2,5c, >5c, >9c) apesar de nem sempre se observarem diferenças estatisticamente significativas, apresentando os carcinomas de alto grau estes parâmetros citométricos altos.

Os carcinomas de padrão bifásico caracterizaram-se por coexistência de áreas transicionais e extensas áreas de tipo adenocarcinoma. Devido às diferenças

morfológicas relativamente aos carcinomas transicionais, este tipo neoplásico deve constituir uma classe neoplásica distinta a incluir na classificação das neoplasias vesicais de Medicina Veterinária. Estas neoplasias bifásicas apresentaram aneuploidia de ADN quer no componente transicional quer no adenocarcinoma o que pode estar associado a agressividade biológica, como observado em Medicina Humana.

SUMMARY

Urinary bladder tumours are rare in all domestic animals species, but are common in grazing cattle in some regions of the world in association with Enzootic Haematuria syndrome. In Veterinary Medicine, Oncology is an area with increasing importance, but little is known about the aetiopathology and morphology of these tumours. The aim of this study is to characterise bovine urothelial tumours and at the same time make a critic review of the veterinary classification, thus increase knowledge in this particular area.

In this study, stains and histochemical methods (H&E, PAS, Alcian Blue, Orcein), were used, as well as imunohistochemistry (CEA, E-cadherin, CD44, CD44v₆, vimentin, p53, p21^{ras}) and analysis of nuclear DNA content by Image Citometry. We studied 55 bladder neoplasias: transitional cell neoplasias (n=47), mixed carcinoma (n=5), adenocarcinoma (n=3) and undifferentiated carcinoma.

All transitional cell carcinomas had malignant phenotype, presented cytological atipia and a highly heterogeneous growing pattern. A high incidence of inverted papilar growing pattern was found as well as extensive areas of glandular differentiation. The univariate analysis demonstrated that nuclear grade correlates significantly with: growing pattern, invasive behaviour, proliferation rates and vimentin expression. The CEA expression was observed specially in high grade carcinomas. E-cadherin expression pattern was heterogeneous in all carcinomas as well in non neoplastic urothelium.

The DNA analysis demonstrated association of classic pathologic parameters and cytometric variables (DNA ploidy, DNA Index and >2,5c, >5c, >9c fractions), but statistic correlations were not always observed.

In mixed carcinoma we observed coexistence of transitional areas and extensive areas of the adenocarcinoma type. Due to their morphologic characteristics this group should constitute a distinct neoplastic class, to be included in the Veterinary Medicine classification of urinary bladder tumours. These tumours presented DNA aneuploidy in the transitional component, as well as in the adenocarcinoma component, which might be associated with biologic aggressiveness, as observed in Human Medicine.

ÍNDICE

RESUMO	VI
SUMMARY	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
ABREVIATURAS E SIGLAS	XIV
INTRODUÇÃO	1
OBJECTIVOS	7
MATERIAL E MÉTODOS	9
AMOSTRAS	10
MÉTODOS	10
1. Análise histológica	10
2. Estudos de imunocitoquímica	12
2.1. Metodologia	13
2.2. Métodos de quantificação da imunoreactividade	14
3. Análise do conteúdo de ADN por Citometria de Imagem (CI)	15
3.1. Procedimento	15
3.2. Quantificação do conteúdo de ADN nuclear	15
ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
RESULTADOS	19
EXAME MACROSCÓPICO	20
EXAME MICROSCÓPICO	21
1. Neoplasias transicionais	22
1.1. Padrão arquitectural	22
Carcinomas de padrão papilar	22
Carcinomas de padrão nodular e misto	24
1.2. Grau nuclear	25
1.2.1. Associação entre o grau nuclear e os parâmetros patológicos	27
Padrão arquitectural	27
Necrose	29
Diferenciação glandular e epidermóide	30
Estroma	30
Invasão e metastização	30

1.2.2. Índices de proliferação	34
1.2.3. Características imunocitoquímicas	36
Vimentina	36
Caderina E	38
CEA	39
Outros marcadores	40
Proteína p53	40
P21 ^{ras}	40
CD44 e CD44 _{v6}	40
2. Carcinomas bifásicos	41
3. Adenocarcinomas	45
4. Carcinomas indiferenciados	47
5. Lesões uroteliais associadas às neoplasias vesicais.....	48
ANÁLISE DE CITOMETRIA DE IMAGEM	53
1. Neoplasias transicionais	53
1.1. Variáveis avaliadas por citometria.....	53
1.1.1. Ploidia de ADN	53
1.1.2. Índice de ADN	61
1.1.3. Conteúdo de ADN <2,5c, >5c e >9c	63
2. Carcinomas bifásicos	68
3. Adenocarcinomas	68
4. Carcinoma indiferenciado	68
5. Urotélio não neoplásico	68
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	93
ANEXOS	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ESTUDOS FUTUROS	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Formação exofítica, irregular, na parede vesical.	20
FIG 2 - Carcinoma de padrão papilar clássico (H&E, 100X).	23
FIG 3 - Carcinoma de padrão papilar invertido (H&E, 100X).	24
FIG 4 - Carcinoma de padrão arquitetural nodular (H&E, 100X).	25
FIG 5 - Carcinoma de baixo grau: núcleos monomórficos com polaridade celular e nuclear mantida (H&E, 200X).	26
FIG 6 - Carcinoma papilar invertido de alto grau: núcleos pleomórficos, bizarros, com heterocromasia marcada e cromatina grumosa (H&E, A: 200X, B:600X).	27
FIG 7 - Carcinoma de baixo grau de padrão papilar invertido (H&E, 200X).	28
FIG 8 - Carcinoma de alto grau evidenciando desorganização arquitetural e necrose de células isoladas (H&E, 200X).	29
FIG 9 - Associação entre necrose e o grau neoplásico.	29
FIG 10 - Invasão da parede vesical.	31
FIG 11 - Carcinoma de alto grau com invasão do córion (H&E, 100X).	32
FIG 12 - Carcinoma de alto grau com invasão da camada muscular própria (H&E, 100X).	32
FIG 13 - Carcinoma de alto grau com êmbolos vasculares (H&E, 100X).	33
FIG 14 - Vaso contendo células embólicas: fibras elásticas da parede vascular evidenciadas com a técnica de Orceína (200x).	33
FIG 15 - Carcinoma de alto grau evidenciando elevada imunoreactividade ao Antígeno Ki-67 (200X).	35
FIG 16 - Associação entre o índice de Ki-67 e o comportamento invasor.	36
FIG 17 - Carcinoma papilar invertido de baixo grau evidenciando imunoreactividade à Vimentina (200x).	37
FIG 18 - Carcinoma de alto grau, apresentando foco de células com intensa imunomarcção à Vimentina (200x).	37
FIG 19 - Imuno-expressão citoplasmática à Caderina E (200x).	38
FIG 20 - CEA: imunoreactividade citoplasmática e no revestimento luminal (200x).....	39
FIG 21 - CEA: imunoreactividade citoplasmática com acentuar membranar (200x).	40
FIG 22 - Carcinoma bifásico de padrão arquitetural papilar (H&E, 40X).	42
FIG 23 - Ampliação da neoplasia anterior, evidenciando área de tipo adenocarcinoma (H&E, 200X).	42
FIG 24 - Carcinoma bifásico: área de tipo adenocarcinoma com diferenciação glandular de tipo intestinal (H&E, 100X).	43
FIG 25 - Ampliação da imagem anterior (H&E, 1000x).	43
FIG 26 - Carcinoma bifásico de padrão arquitetural papilar invertido (H&E, 200X).	44

FIG 27 - Carcinoma bifásico: positividade ao CEA no componente adenocarcinoma (200x).	44
FIG 28 - Adenocarcinoma com áreas glandulares de tipo intestinal (H&E, 40X).	46
FIG 29 - Ampliação da neoplasia anterior evidenciando atipia citológica e figuras de mitose (H&E, 200X).	46
FIG 30 - Carcinoma indiferenciado: perda da arquitectura e atipia citológica marcada (H&E, A: 200X, B: 600x).	47
FIG 31 - Hiperplasia nodular com áreas de diferenciação glandular de tipo intestinal (H&E, 200x).	49
FIG 32 - Diferenças entre o índice de Ki-67 do urotélio normal e hiperplásico.	50
FIG 33 - Diferenças entre o índice de Ki-67 das lesões hiperplásicas e neoplásicas.	50
FIG 34 - Diferenças de imunorreactividade ao Antígeno Ki-67 de um carcinoma de alto grau e uma lesão de hiperplasia nodular (200X).	51
FIG 35 - Lesão de displasia de alto grau (H&E, 200X).	52
FIG 36 - Urotélio não neoplásico: imunorreactividade citoplasmática e membranar à Caderina E (200X).	52
FIG 37 - Histograma diplóide de ADN.	54
FIG 38 - Carcinoma de baixo grau com crescimento papilar invertido, que apresentou conteúdo de ADN diplóide (H&E, 100X).	54
FIG 39 - Associação entre a ploidia de ADN e o padrão arquitectural.	55
FIG 40 - Histograma aneuplóide de ADN apresentando células com conteúdo de ADN >9c.	56
FIG 41 - Carcinoma papilar invertido de alto grau com crescimento com conteúdo de ADN aneuplóide, evidenciando heterocromasia e anisocariose (H&E, A: 200X, B: 600x).	56
FIG 42 - Associação entre a ploidia de ADN e o comportamento invasor.	57
FIG 43 - Carcinoma anaplásico com conteúdo multiplóide de ADN (H&E, 200X).	58
FIG 44 - Histograma multiplóide de ADN.	58
FIG 45 - Associação entre a ploidia de ADN e a imuno-expressão do Antígeno Ki-67.	59
FIG 46 - Histograma aneuplóide de ADN evidenciando uma população celular diplóide de ADN. .	60
FIG 47 - Carcinoma de alto grau aneuplóide de ADN (H&E,400x).	60
FIG 48- Associação entre o Índice de ADN (ID) e o padrão morfológico.	61
FIG 49 - Associação entre o Índice de ADN (ID) e a expressão de Antígeno Ki-67.	62
FIG 50 - Associação entre a fracção de células com conteúdo anómalo de ADN (>2,5c, >5c e >9c) e o padrão arquitectural.	64
FIG 51 - Associação entre a fracção de células com conteúdo anómalo de ADN (>2,5c, >5c e >9c) e a invasão da parede vesical.	65
FIG 52 - Metástase hepática de carcinoma de alto grau (H&E, 200x).	66
FIG 53 - Fracção de células verdadeiramente aneuplóides (>5c) das lesões de hiperplasia e neoplasia.	69

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros avaliados no exame de microscopia fotónica das neoplasias vesicais e urotélio não neoplásico adjacente.	11
Tabela 2 - Anticorpos primários e procedimentos informativos.	14
Tabela 3 - Classificação histológica das neoplasias uroteliais observadas.	21
Tabela 4 - Classificação do grau nuclear.	26
Tabela 5 - Associação entre as variáveis patológicas e o grau nuclear.	97
Tabela 6 - Associação entre o padrão arquitetural e o grau neoplásico.	28
Tabela 7 - Índice mitótico dos carcinomas transicionais.	34
Tabela 8 - Índice de ki-67 dos carcinomas transicionais de baixo e alto grau.	34
Tabela 9 - Estudos de imunocitoquímica realizados na análise dos carcinomas transicionais.	98
Tabela 10 - Índice mitótico e de antigénio ki-67 dos componentes transicional e adenocarcinoma dos carcinomas bifásicos.....	41
Tabela 11 - Lesões não neoplásicas adjacentes às neoplasias transicionais.....	49
Tabela 12 - Índice de proliferação das lesões de hiperplasia e urotélio normal.....	51
Tabela 13 - Associação entre a ploidia de ADN e os parâmetros patológicos.	98
Tabela 14 - Associação entre ploidia de ADN e o grau neoplásico.	55
Tabela 15 - Associação entre ploidia de ADN e os índices de proliferação.	57
Tabela 16 - Associação entre o índice de ADN (ID) e o índice mitótico.....	62
Tabela 17 - Associação entre o Índice de ADN e os parâmetros patológicos.	99
Tabela 18 - Intervalos de variação das variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c.	63
Tabela 19 - Associação das variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c e o grau neoplásico.	64
Tabela 20 - Associação entre a fracção de células com conteúdo de ADN anómalo (>2,5c, >5c, >9c) e a imunorreactividade ao antigénio ki-67.	67
Tabela 21 - Associação entre as variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c e os parâmetros patológicos.	99
Tabela 22 - Valores das variáveis citométricas > 2,5c, >5c e >9c.	69
Tabela 23 - Diferenças entre os índices citométricos das lesões de hiperplasia e neoplasia.	70

ABREVIATURAS E SIGLAS

ADN - Ácido desoxiribonucleico.

AgNors -Regiões organizadoras nucleolares

BPV - “Bovine Papillomavirus”- Vírus da Papilomatose bovina

CD44 - “Cluster differentiation 44”

CD44v6 - “Cluster differentiation 44 exão 6”

CEA - Antigénio carcinoembrionário

CV - Coeficiente de variação

DAB - Tetrahidrocloreto de 3’3 diaminobenzidina

H&E - Coloração de Hematoxilina - Eosina

HEC - Hematúria Enzoótica crónica

ID - Índice de ADN

n - Número de observações

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAS - Ácido Periódico de Schiff

PBS - Tampão Fosfato salino

PCR - “Polymerase Chain reaction” - Reacção em cadeia pela Polimerase

PCNA - “Cell proliferation associated nuclear antigen” - Antigénio de proliferação nuclear

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em alguns países industrializados, aproximadamente 30,0% da mortalidade deve-se a neoplasias malignas. Em cada ano a incidência e mortalidade por neoplasias aumenta, independentemente do envelhecimento da população (Maltoni e Selikoff, 1988). Na sociedade moderna o cancro afecta um em cada cinco indivíduos, sendo frequentemente resistente à quimioterapia e/ou radioterapia. É a doença mais temida pela maioria da população, suplantando o temor da Tuberculose no século passado, da Peste Bubónica na Idade Média ou da Lepra nos tempos bíblicos (Baker, 1996).

O cancro de bexiga é um grave problema mundial representando aproximadamente 2 a 5,0% de todas as neoplasias malignas (Ayala e Ro, 1989; Presti *et al.*, 1991; Doll, 1992). É a quarta neoplasia maligna mais comum no homem e a nona na mulher (Scher *et al.*, 1997). Nas últimas décadas a incidência anual tem aumentado (Murphy *et al.*, 1996; Scher *et al.*, 1997; Trichopoulos *et al.*, 1997) e apesar da evolução nas técnicas de diagnóstico e tratamento, a taxa de mortalidade tem-se mantido relativamente constante (Cotran *et al.*, 1989; Murphy 1997).

O carcinoma de células transicionais da bexiga é a neoplasia do tracto urinário mais comum do mundo desenvolvido, importante não apenas pela sua frequência, mas pelo seu comportamento biológico diverso, imprevisível (Carbin *et al.*, 1991; Bringuier *et al.*, 1993; Fradet e Cordon-Cardo, 1993; Reznikoff *et al.*, 1996) e tendência a multipolicronismo (Griffiths, 1992; Wagner *et al.*, 1995; Chern *et al.*, 1996; Griffiths *et al.*, 1996; Young e Eble, 1996). É a segunda causa de morte mais comum por neoplasias genito-urinárias (Stein *et al.*, 1998). A sua relação com a carcinogénese química é reconhecida, estando bem documentadas as associações com a exposição ocupacional a anilinas, arilaminas, manufactura da borracha e ao fumo do tabaco (Murphy, 1992; Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Strickland e Kensler, 1995; Murphy *et al.*, 1996; Ordoñez e Rosai, 1996).

Os agentes carcinogénicos podem ser considerados marcadores patológicos do nosso tempo (Maltoni e Selikoff, 1988). Os carcinogénios são ubiqüitários no ambiente e o seu potencial lesivo preocupante (Rubin e Farber, 1994). Estima-se que os poluentes ambientais contribuem em 1,0-2,0% dos cancros fatais, principalmente do pulmão e bexiga (Trichopoulos *et al.*, 1996). Nos EUA, a exposição a carcinogénios ambientais contribui em mais de 25,0% dos casos de cancro de bexiga nos caucasianos e 10,0% nos restantes grupos raciais (Scher *et al.*, 1997). Em áreas muito industrializadas o aumento da prevalência de neoplasias vesicais em cães é considerado indicador de acumulação de carcinogénios no ambiente (Phillips, 1999).

As neoplasias da bexiga são raras em todos os animais domésticos (Cardellino, 1993; Gimeno *et al.*, 1994; Phillips, 1999), mas têm sido referidas como comuns em bovinos de algumas regiões do mundo, atingindo a prevalência de 25,0% em bovinos de idade superior a dois anos, abatidos em matadouro. Estas neoplasias estão associadas a um síndrome designado de Hematúria Enzoótica Crónica (HEC), cuja ocorrência em bovinos criados em regime extensivo tem sido associada com a distribuição geográfica do feto vulgar (*Pteridium aquilinum*) (Campo *et al.*, 1992; de Oliveira, 1993; Cardellino, 1993; Ozkul e Aydin, 1996), sendo as neoplasias vesicais raras em áreas onde o feto não é endémico (EUA e Quênia) (Cardellino, 1993).

O feto *P. aquilinum* é um agente carcinogénico com ampla distribuição na natureza (de Oliveira, 1993; Smith e Seawright, 1995). A sua toxicidade aguda e crónica em várias espécies animais (Gerenutti *et al.*, 1992; Ngomuo e Jones, 1996b; Jean-Blain, 1998; Shahin *et al.*, 1998) constitui um grave problema veterinário em vários países, tendo atraído a atenção de investigadores desde o final do século passado (de Oliveira, 1993). A Hematúria Enzoótica é processo mórbido que cursa frequentemente com neoplasias, particularmente gastrintestinais e vesicais de natureza epitelial e mesenquimatosa (de Oliveira, 1993; Seawright, 1995), por vezes coexistindo no mesmo animal (Cardellino, 1993; Gimeno *et al.*, 1994).

Além das neoplasias de ocorrência natural, as evidências da carcinogenicidade do feto derivam também da experimentação animal e de estudos epidemiológicos humanos (Shahin *et al.*, 1997; Hirono, 1989; Campo *et al.*, 1997). A indução experimental da Hematúria Enzoótica foi realizada pela primeira vez por Rosemberg e Heesch (1960) em bovinos alimentados com feto (de Oliveira, 1993; Lal-Krishhna e Dawara, 1994; Durão *et al.*, 1995) e as neoplasias obtidas foram idênticas às de ocorrência natural, nos aspectos histológicos e patológicos (Campo *et al.*, 1992; Cardellino, 1993). O feto é usado na alimentação humana em várias regiões do mundo (Pamukcu *et al.*, 1976; Gerenutti *et al.*, 1992; de Oliveira, 1993), o que pode contribuir para o aumento da incidência de neoplasias humanas gastrintestinais e vesicais (de Oliveira, 1993; Prakash *et al.*, 1996).

O *P. aquilinum* possui agentes mutagénicos, carcinogénicos e imunodepressores (Campo *et al.*, 1992; Campo *et al.*, 1997). Os animais alimentados com este feto desenvolvem imunodepressão crónica, hematúria enzoótica e neoplasias (Campo *et al.*, 1997). A imunodepressão parece ser necessária mas não suficiente para a progressão neoplásica enquanto compostos carcinogénicos adicionais presentes no feto parecem ser factores determinantes (Campo *et al.*, 1994). O possível sinergismo entre o feto, factores virais, químicos e imunológicos na génese das neoplasias também não é clara. Aparentemente o Papilomavírus Bovino tipo 2 (BPV-2) é o vírus mais frequentemente implicado nas neoplasias vesicais,

tendo sido detectado ADN viral em 46,0% das neoplasias espontâneas por Southern Blotting. Nas Highlands escocesas, a alta frequência de neoplasias do tracto digestivo em bovinos apresenta uma relação epidemiológica bem conhecida com a ingestão do feto e com a infecção pelo Papilomavírus Bovino tipo 4. Cerca de 30,0% dos animais com neoplasias digestivas apresentam também lesões vesicais que incluem hemangiomas, hemangiossarcomas, fibromas, carcinomas transicionais e adenocarcinomas (Campo *et al.*, 1992).

A carcinogenicidade da planta foi atribuída à quercetina, ácido shiquímico e ptaquilosídeo (Ngomuo e Jones, 1996b). A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) e seus derivados exercem efeitos citotóxicos, mas não são agentes etiológicos directos da intoxicação pelo feto nos bovinos (Ngomuo e Jones, 1996a); interfere com as vias de transdução celulares (Campo *et al.*, 1997) e provavelmente actua como cocarcinogénio do Papilomavírus Bovino (Pamacku *et al.*, 1980; Ngomuo *et al.*, 1996).

O Ptaquilosídeo, glicosídeo altamente instável à temperatura ambiente, é aparentemente o princípio carcinogénico (Hirono *et al.*, 1984; Seawright, 1995; Bringuier *et al.*, 1995; Prakash *et al.*, 1996). Em condições alcalinas é activado à forma de dienona instável, composto considerado o princípio mutagénico e carcinogénico do ptaquilosídeo que induz a alquilação do ADN (Hirono *et al.*, 1984; de Oliveira, 1993; Moore *et al.*, 1997; Jean-Blain, 1998). A sua genotoxicidade foi confirmada pelo teste de Ames em *Salmonella typhimurium* TA 98 e TA 100 e demonstrada em roedores (Hirono *et al.*, 1984; de Oliveira, 1993). Foram detectadas mutações no gene H-ras em carcinomas do tracto digestivo superior de bovinos e em carcinomas vesicais e intestinais de roedores (Prakash *et al.*, 1996; Shahin *et al.*, 1998), e mutações no gene p53 em carcinomas espontâneos e experimentais, sendo estes 2 genes alvos potenciais dos carcinogénios químicos (Campo *et al.*, 1997). A urina dos herbívoros possui pH alcalino, o que pode favorecer a activação do ptaquilosídeo (Prakash *et al.*, 1996) justificando a elevada prevalência de alterações pré-neoplásicas e neoplásicas observadas da parede vesical dos bovinos.

Em alguns pontos do planeta, o feto possui concentrações muito altas de ptaquilosídeo, dependendo assim a actividade carcinogénica do genótipo da planta e das condições geográficas (de Oliveira, 1993). Este composto é transferido para o leite, existindo evidências epidemiológicas de que o carcinogénio, em condições especiais, possa causar neoplasias no homem (Smith e Seawright, 1995). O leite proveniente de vacas que consumiram o feto é carcinogénico para roedores (Pamucku *et al.*, 1978; Villalobos-Salazar *et al.*, 1989; Durão *et al.*, 1995; Pamucku *et al.*, 1996) sugerindo que há eliminação láctica de metabolitos com maior actividade carcinogénica que os extractos do próprio feto (Villalobos-Salazar *et al.*, 1989). A actividade mutagénica de extractos de leite extraídos pelo clorofórmio/metanol foi demonstrada em

S. typhimurium TA 100 (Pamucku *et al.*, 1978). Alguns autores indicam assim a possibilidade de existência de riscos para a saúde pública por exposição indirecta a carcinogénios excretados por via láctica (Villalobos-Salazar *et al.*, 1989; de Oliveira, 1993; Alonso, 1996).

Neste trabalho, além da caracterização das neoplasias vesicais em microscopia óptica, foram realizados estudos de histoquímica, imunohistoquímica e de análise da ploidia de ADN por Citometria de Imagem. Em virtude de serem técnicas dispendiosas, por vezes morosas, não são usadas correntemente no diagnóstico em Medicina Veterinária, pelo que não encontramos praticamente referências, na literatura consultada, a estas técnicas em animais de interesse pecuário; encontramos apenas estudos de imunohistoquímica em animais de companhia e dois estudos de citometria de ADN em neoplasias vesicais caninas.

Tradicionalmente, a caracterização das neoplasias vesicais é realizada com base em critérios histológicos e citológicos (diferenciação neoplásica, pleomorfismo, celularidade, índice mitótico, necrose, tipos celulares) (Farsund *et al.*, 1984); contudo, estes parâmetros por vezes não conseguem prever de forma eficaz o comportamento biológico das neoplasias (Scharpers *et al.*, 1993). Consequentemente, desenvolveram-se esforços para identificar marcadores de prognóstico que auxiliassem na avaliação da história natural das neoplasias (Farsund *et al.*, 1984; Stöckle *et al.*, 1993; Vindelov *et al.*, 1995) como os estudos imunohistoquímicos, citogenéticos e da ploidia de ADN (Pauwels *et al.*, 1988).

Uma das técnicas utilizadas no estudo da biopatologia tumoral é a análise do conteúdo de ADN (Scharpers *et al.*, 1993). O seu interesse reside no facto de a instabilidade genética ser uma característica das células neoplásicas, importante em todas as fases da tumorigénese. Alterações genéticas a nível molecular, na estrutura cromossómica e/ou alterações quantitativas do conteúdo de ADN, têm sido referidas em várias neoplasias (Lee *et al.*, 1994; Nenning *et al.*, 1997) e geralmente as neoplasias malignas possuem populações celulares com conteúdo de ADN anómalo, o que se associa a evolução adversa (Murphy, 1992; Ferreira *et al.*, 1997). A aneuploidia pode ser um indicador de instabilidade genética nas populações neoplásicas, o que pode conduzir a rápida proliferação e aparecimento de novos fenótipos (heterogeneidade tumoral) (Auer *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 1997). O aumento da variabilidade genética pode ser detectada por citometria de ADN (Nenning *et al.*, 1997). Estes estudos da ploidia de ADN fornecem assim informação complementar para determinar o comportamento biológico das lesões (Auer *et al.*, 1980; Sasaki *et al.*, 1992; Clemo *et al.*, 1994; Weid *et al.*, 1995; Bittard *et al.*, 1996) e monitorizar a sua história natural (van Velthoven *et al.*, 1995).

A Conferência de Consenso de Citometria confirmou a utilidade clínica da citometria de fluxo em neoplasias vesicais (Fradet e Cordon-Cardo, 1993; Wheeless *et al.*, 1993; Nenning *et al.*, 1997; Tachibana *et al.*, 1999). As técnicas de Citometria de Fluxo e de Imagem são usadas para quantificar o conteúdo de ADN, existindo concordância entre 80 e 100% nos resultados obtidos pelos 2 métodos (Cohen *et al.*, 1991; Clemo *et al.*, 1993; Scharpers *et al.*, 1993; Goulandris *et al.*, 1996); os resultados discordantes são provavelmente resultado de diferenças nas técnicas de amostragem, de preparação do material e na interpretação dos histogramas (Lajoir *et al.*, 1993). A maioria dos estudos publicados baseiam-se na técnica de citometria de fluxo, razão pela qual a citometria de imagem não foi considerada na Reunião de Consenso acima mencionada (Nenning *et al.*, 1997). A análise da ploidia de ADN baseia-se no pressuposto de que o conteúdo de ADN nuclear das células em G_0/G_1 está correlacionado com o número de cromossomas e outras características do ciclo celular (Lee *et al.*, 1994). As alterações da ploidia de ADN estão estreitamente relacionadas com o grau histológico e o estadió das neoplasias, nomeadamente em carcinomas vesicais (Farsund *et al.*, 1984; Clemo *et al.*, 1994; van Velthoven *et al.*, 1995; Vindelov *et al.*, 1995).

Em Medicina Veterinária o estudo da Oncologia começa a emergir, sobretudo na clínica de animais de companhia; contudo, relativamente aos animais de interesse pecuário, muito se desconhece sobre o determinismo e patogenia das doenças oncológicas, pelos interesses económicos subjacentes e abate precoce dos animais. Só quando as doenças são causadoras de perdas económicas importantes e/ou podem ter implicações na saúde pública, como é o caso da Leucose Enzoótica Bovina, os estudos são realizados.

Este trabalho não teve como objectivo principal o estudo da etiopatogenia das neoplasias do urotélio vesical bovino, mas pretende ser um contributo para a compreensão da sua biopatologia, aspectos morfológicos e de ploidia de ADN.

OBJETIVOS

OBJECTIVOS

Os objectivos deste estudo são a caracterização biopatológica das neoplasias uroteliais bovinas:

- Caracterização das características morfológicas e análise dos factores que influenciam o seu comportamento biológico.
- Caracterização das suas características histoquímicas e imunohistoquímicas.
- Análise do conteúdo de ADN por citometria de imagem.
- Estudo da associação entre as variáveis biológicas e citométricas estudadas e os parâmetros patológicos clássicos.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS

Foram estudados 55 carcinomas primários da bexiga. As amostras eram provenientes de abates efectuados no Matadouro Frigorífico Industrial de Ponta Delgada, Açores, entre os anos de 1994 e 1996. A amostragem incluía 51 bovinos do sexo feminino, adultos, de aptidão leiteira, com idade média de 6 anos.

O material chegou ao Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro já fixado em formaldeído a 10%, com tempo de fixação desconhecido. O material foi processado em parafina e dos blocos resultantes realizaram-se vários cortes para estudos histopatológicos, técnica de histoquímica e imunocitoquímica e análise de ADN.

As neoplasias vesicais, incluídas em parafina, foram seleccionadas em função da quantidade de material existente em arquivo. As preparações foram coradas com Hematoxilina de Gill e Eosina (H&E) seguindo os procedimentos de rotina para material fixado em parafina. Todas as preparações histológicas foram revistas e classificadas. Sempre que possível foram seleccionadas preparações histológicas representativas que apresentavam neoplasia e tecido não neoplásico, como padrão de normalidade e para uma possível avaliação comparativa.

MÉTODOS

1. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Além da avaliação histológica das neoplasias vesicais foram ainda analisadas as variáveis patológicas sumariadas na Tabela 1:

Tabela 1 - Parâmetros avaliados no exame de microscopia fotônica das neoplasias vesicais e urotélio não neoplásico adjacente.

Multifocalidade	Presente/ausente
Coexistência com neoplasia vascular	Presente/ausente
Padrão de crescimento	Papilar Não papilar ou nodular Padrão misto (presentes componentes papilar e não papilar)
Tipo histológico e grau de diferenciação	Carcinoma transicional Alto grau Baixo grau Carcinoma espinocelular Bem diferenciado Pouco diferenciado Adenocarcinoma Bem diferenciado Pouco diferenciado Carcinoma bifásico (Transicional e glandular) Carcinoma indiferenciado
Estroma neoplásico	Abundância Alterações do estroma Desmoplasia Alterações mixóides
Infiltrado celular no estroma	Abundância Tipo celular predominante
Índice mitótico	Número de mitoses na neoplasia e urotélio não neoplásico
Invasão da parede	Ausente Invasão do córion Invasão da túnica muscular própria Invasão dos tecidos perivesicais
Permeação vascular linfática/sanguínea	Presente/Ausente
Metástases conhecidas	Não/Sim (orgão (s))
Alterações do urotélio não neoplásico Hiperplasia	Ausente Hiperplasia simples Hiperplasia papilar Hiperplasia nodular (ninhos de von Brunn) Hiperplasia mista (apresentando mais que um tipo de hiperplasia simultaneamente).
Metaplasia	Ausente Metaplasia glandular Metaplasia epidermóide Metaplasia mista (apresentando mais que um tipo de metaplasia simultaneamente).
Displasia de alto grau	Ausente/Presente

Sempre que ocorria multiplicidade e ambas as neoplasias eram de tipo transicional, foi seleccionada para estudo aquela que apresentava características histológicas classicamente associadas a pior comportamento biológico (atipia citológica, invasão da parede vesical,

permeação vascular). Sempre que coexistiam neoplasias de diferentes tipos histológicos, todas foram seleccionadas para estudo.

*** Avaliação do Índice mitótico**

A contagem de mitoses foi efectuada nas áreas neoplásicas e não neoplásicas que apresentavam celularidade e actividade replicativa mais elevadas. O índice mitótico foi obtido pela contagem do número total de figuras mitóticas observadas em 500 células, usando uma objectiva de grande ampliação (40x) e ocular com retículo (Zeiss®).

*** Avaliação do tipo de mucopolissacarídeos**

Para analisar a presença de áreas de diferenciação glandular, o tipo de mucinas produzidas e a ocorrência de alterações na composição da matriz conjuntiva do estroma neoplásico, recorreu-se à coloração histoquímica conjunta de PAS-Azul Alciano. O procedimento de coloração utilizado foi a técnica laboratorial de rotina destas duas colorações. Para remover os depósitos celulares de hidratos de carbono e se detectassem apenas mucopolissacarídeos a coloração foi realizada após a incubação prévia das preparações histológicas em câmara húmida numa solução aquosa de diastase 1% a 37°C, durante 60 minutos.

*** Avaliação da permeação vascular**

Para avaliar a permeação linfática recorreu-se a uma técnica de histoquímica de orceína para evidenciar as fibras elásticas das paredes vasculares.

2. ESTUDOS DE IMUNOCITOQUÍMICA

Durante este estudo utilizámos vários anticorpos para estudar a imuno-expressão de genes (TP53, ras), moléculas de adesão (Caderina E, CD44 e CD44,6), antigénios embrionários (CEA), antigénios associados ao ciclo celular (Ki-67) e proteínas do citoesqueleto (Vimentina, Panqueratina). Foram utilizados soros primários policlonais produzidos em coelho e outros monoclonais obtidos em murganho, diluídos em Tampão fosfato salino (PBS) pH 6,0±0,2.

Os anticorpos foram inicialmente testados em tecido vesical bovino para confirmar a sua aplicação na espécie, otimizar a diluição mais adequada, averiguar a necessidade de realizar tratamento térmico ou proteolítico para aumentar a exposição dos epítopes e incrementar a imuno-expressão. Todos os estudos foram realizados segundo o método indirecto da Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) e o seu procedimento foi sempre idêntico. As incubações foram realizadas em câmara húmida e todas as diluições e lavagens foram realizadas com PBS.

2.1. Metodologia

Para a realização dos exames imunocitoquímicos foram efectuados cortes de parafina com 2 :m de espessura, colados em lâminas revestidas com gelatina.

Após desparafinação e hidratação, os cortes histológicos foram submetidos a tratamento térmico em tampão citrato 0,01M pH 6,0 no microondas (750 W). Alguns estudos requereram ainda tratamento enzimático em meio ácido com tripsina (Merck) para amplificar a detecção antigénica. Posteriormente as preparações foram incubadas durante 30 minutos numa solução aquosa de Peróxido de Hidrogénio (H_2O_2) a 3% (Panreac Quimica, SA) para bloquear a actividade das peroxidases endógenas. A imunorreactividade inespecífica foi eliminada pela incubação durante 30 minutos com soro normal não imune, diluído em PBS na relação 1:5, soro de coelho (Dako) para os soros monoclonais e soro de porco para os policlonais (Dako). Posteriormente as preparações foram incubadas em soro primário (Tabela 2)

Após exposição ao anticorpo primário as lâminas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente com o soro de ligação secundário biotilado adequado (imunoglobulinas coelho anti-rato (Dako, E0354) 1:400 ou soro de suíno anti-coelho (Dako, E0353) 1:500. Para amplificar o reconhecimento dos epítopes foi utilizado o soro complexo avidina-biotina peroxidase (Dako, K377).

A reacção de peroxidase foi visualizada usando como cromogéneo o tetrahydrocloro de 3`3 diaminobenzidina (DAB) (Novocastra, NCL-DAB) e H_2O_2 a 30%. A reacção foi interrompida com água destilada e seguidamente as preparações foram contrastadas com hematoxilina de Gill durante 40 segundos, diafanizadas e montadas com Entellan® (Merck).

Os estudos foram realizados na totalidade da amostra seleccionada, com excepção dos soros Caderina E, p53 e p21 (realizados em 22 neoplasias), CD44, CD44,6 e Citoqueratinas (realizados em 10 neoplasias).

Tabela 2 - Anticorpos primários e procedimentos informativos

Anticorpo	Tipo	Fonte	Diluição	Procedimento
Ki67 (Clone MiB1)	Monoclonal	Dako	1:100	Digestão enzimática com Tripsina. 3 ciclos de MO de 5 minutos. Incubação ON.
CEA A0115	Policlonal	Dako	1:90	Não efectuado tratamento enzimático ou térmico.
Vimentina NCL-Vim-Va	Monoclonal	Dako	1:100	2 ciclos de MO de 5 minutos. Incubação 60 minutos a 25°C.
Queratina Z0622	Policlonal	Dako	1:100	2 ciclos de MO de 5 minutos. Incubação 60 minutos a 25°C.
p53 (Clone DO-7) M7001	Monoclonal	Dako	1:50	Digestão enzimática com Tripsina. 3 ciclos de MO de 5 minutos. Incubação ON.
P21 ^{ras} M0637	Monoclonal	Dako	1:80	Digestão enzimática com Tripsina. 3 ciclos de MO de 5 minutos. Incubação ON.
Caderina E Clone HECD-1	Monoclonal	R&D systems	1:200	1 ciclo de MO de 10 minutos. Incubação ON.
CD44 DF1418	Monoclonal	Dako	1:80	3 ciclos de MO de 2 minutos. Incubação ON.
CD44 _{v6} Clone VFF-7	Monoclonal	Bender Med Systems	1:20	3 ciclos de MO de 2 minutos. Incubação ON.

(MO: tratamento térmico em microondas).

(ON: incubação durante a noite a 4°C)

Lâminas de controlo

Controlo positivo: para controlo interno e avaliação da imunorreactividade dos anticorpos CD44 e CD44v6 foram utilizadas secções de cérvix uterino de mulher não neoplásico. Os carcinomas epidermóides da terceira pálpebra de bovinos foram usados como controlo nos estudos da expressão do gene p53.

Controlo negativo: as preparações foram submetidas ao procedimento habitual referido previamente, tendo-se substituído o anticorpo primário por PBS.

2.2. Métodos de quantificação da imunorreactividade

Antigénio Ki-67

Como o índice mitótico apenas permite avaliar uma pequena proporção de células em citocinése, a fracção de crescimento neoplásico foi também avaliada recorrendo ao anticorpo anti-antigénio Ki-67. A quantificação da marcação foi realizada pela contagem dos núcleos marcados de 500 células neoplásicas, identificadas por critérios morfológicos, em um ou mais campos de grande ampliação. As áreas neoplásicas que revelavam maior imunorreactividade

foram submetidas a contagem tendo sido contabilizados apenas os núcleos homoganeamente marcados. A contagem foi realizada com objectiva de 40x usando uma ocular com retículo (Zeiss®). Os valores obtidos foram expressos pela relação entre as células marcadas e o número total de células contabilizadas, obtendo-se uma relação percentual considerada como índice de proliferação.

Foi também avaliado o índice de Ki-67 no urotélio não neoplásico adjacente às neoplasias segundo o procedimento acima referido.

Vimentina

Foi analisada a ocorrência de imunoreactividade no citoplasma das células neoplásicas. Este marcador permitiu ainda avaliar a preservação antigénica do material em estudo.

CEA

Foram consideradas positivas todas as neoplasias com marcação superior a 10% das células neoplásicas. A imunoreactividade foi avaliada quanto à extensão de marcação (negativa, focal, multifocal ou difusa) e sua localização (citoplasma e membrana luminal do urotélio).

Caderina E

A imunoreactividade desta glicoproteína foi avaliada no tecido não neoplásico e neoplásico de acordo com a sua localização na membrana citoplasmática ou no citoplasma da célula. A imunomarkação foi classificada como:

- Normal (marcação da membrana celular);
- Marcação citoplasmática;
- Negativa (completa ausência de imunoreactividade).

Foi ainda avaliada a extensão da marcação na totalidade da massa neoplásica e tecido não neoplásico, como focal, multifocal e difusa.

3. ANÁLISE DO CONTEÚDO DE ADN POR CITOMETRIA DE IMAGEM (CI)

Os estudos do conteúdo de ADN fornecem informações úteis sobre as características biológicas de um vasto número de neoplasias humanas (Merkel *et al.*, 1987) nomeadamente neoplasias vesicais (van Velthoven *et al.*, 1995; Nenning *et al.*, 1997). A avaliação do teor de ADN

nas neoplasias de bexiga é útil para avaliar a sua história natural, tendo-se verificado que nos carcinomas uroteliais humanos, a aneuploidia de ADN aumenta com o grau histológico (Sasaki *et al.*, 1992; van Velthoven *et al.*, 1995).

3.1 Procedimento

Para a realização dos estudos citométricos foram efectuados cortes de 6 μ m da totalidade das neoplasias vesicais em estudo, incluídas em parafina. Foram analisadas 55 neoplasias uroteliais e 20 lesões de hiperplasia presentes na periferia das neoplasias vesicais.

As preparações histológicas, coladas em gelatina, foram coradas pelo método de Feulgen usando o *kit* de coloração “CAS DNA” (Becton Dickinson, Cell Analysis Systems, Elmhurst, III). A reacção de Feulgen produz uma coloração azulada do ADN nuclear que reflecte uma ligação estequiométrica do corante ao ADN (Cohen *et al.*, 1991; Chieco e Derenzini, 1999).

Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Em todos os banhos de coloração foi utilizada uma lâmina de hepatócitos de rato, fornecida pelo fabricante do Kit, para a calibração do aparelho e controlo externo da coloração (Cajulis *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1997).

Após desparafinação e hidratação, as preparações histológicas juntamente com a lâmina de calibração, foram submetidas a hidrólise numa solução de Ácido Clorídrico 5N (Merck), durante 60 minutos. Em seguida as preparações foram transferidas para a solução de coloração durante 60 minutos, após os quais as lâminas foram submetidas à “solução de lavagem” e diferenciadas em álcool ácido a 1%. Posteriormente procedeu-se à desidratação e montagem das preparações histológicas.

3.2 Quantificação do conteúdo de ADN nuclear

A quantificação e interpretação dos resultados foi efectuada no sistema de análise de imagem CAS 200® (Cell Analysis Systems, Inc., Elmhurst, III) através do programa “Quantitative DNA Analysis 3.0”. Esta quantificação baseia-se no princípio de que a densidade óptica nuclear detectada pelo aparelho é proporcional à quantidade de ADN presente nos núcleos (DeCresce, 1986; Lee *et al.*, 1994).

O sistema de análise de imagem foi calibrado com a lâmina de hepatócitos de rato, com um conteúdo de ADN conhecido (Cohen *et al.*, 1991). Após a calibração procedeu-se à análise das preparações histológicas de bexiga. Em cada preparação histológica foi analisado o valor médio de ADN de um número mínimo de vinte linfócitos presentes no estroma das neoplasias em estudo; estas células de referência foram usadas como controlo interno da ploidia, definindo o conteúdo de ADN diplóide (2c).

A análise do conteúdo de ADN das células neoplásicas e hiperplásicas foi realizada pela leitura de pelo menos 100 núcleos bem preservados, evitando-se os núcleos sobrepostos, destruídos ou marginais (Cajulis *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1997).

Os resultados dos estudos de citometria de imagem, obtidos sob a forma de histogramas de ADN, representam a distribuição da população celular de acordo com a intensidade de coloração do ADN.

Da análise dos histogramas de ADN é possível avaliar diversos parâmetros, como a ploidia de ADN, o índice de ADN (ID), a percentagem de células com conteúdo anómalo de ADN, superior a 2,5c, 5c e 9c e outros parâmetros citométricos. Para a interpretação dos histogramas foram estabelecidos os seguintes parâmetros:

População diplóide (2n ou 2c): é a população com um conteúdo de ADN considerada normal, igual ao teor de ADN das células de referência para uma determinada espécie (Sampedro e Orfao, 1993).

População aneuplóide: é a população ou clone celular com conteúdo de ADN anómalo (Sampedro e Orfao, 1993), distinto da população celular diplóide (Chin *et al.*, 1985).

População de células de referência: é a população celular utilizada como valor padrão da ploidia de ADN (Auer *et al.*, 1980). A nossa população de referência foi constituída por linfócitos presentes no estroma neoplásico de cada caso analisado.

Pela análise dos histogramas, em cada neoplasia foi identificado o pico G_0/G_1 e calculado o índice de ADN médio (ID), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV).

O CV das células de referência, foi utilizado como controlo de qualidade dos estudos citométricos realizados. Este parâmetro expressa a variabilidade da população de células nas fases G₀/G₁ do ciclo celular (Sampedro e Orfao, 1993).

As populações celulares aneuplóides podem mostrar diferentes conteúdos de ADN e o grau de variação deste relativamente às células normais é expresso como Índice de ADN (ID); este parâmetro é determinado pela razão entre o conteúdo de ADN do pico G₀/G₁ do histograma da população em estudo e o valor médio do pico G₀/G₁ da população de referência (diploide) (Merkel *et al.*, 1987; Koss *et al.*, 1989; Sampedro e Orfao, 1993; van Velthoven *et al.*, 1995; Reeder *et al.*, 1997; Roels *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1999). No caso das neoplasias diploides o valor de ID é 1 (Merkel *et al.*, 1987; van Velthoven *et al.*, 1995).

A região diploide de ADN foi definida como o conteúdo de ADN compreendido entre os valores de ID médio da população de referência ± 2 desvios padrões (Schmit, 1994). Todas as neoplasias cujo pico G₀/G₁ apresentava ID médio com valores compreendidos nesta região diploide foram classificadas como diploides de ADN; todas as que possuíam ID fora desta região foram classificadas como aneuplóides de ADN. Todas as neoplasias aneuplóides que apresentavam histogramas com mais do que um pico G₀/G₁ foram classificadas como multiploides de ADN.

Foram ainda avaliadas as percentagens de células com conteúdo de ADN superior a 2,5c, 5c e 9c. Esta avaliação é importante pelo facto de as células com conteúdo de ADN superior a 2,5c poderem representar células em proliferação enquanto a percentagem de células com valor de ADN >5c corresponde a núcleos verdadeiramente aneuplóides (Auer *et al.*, 1980), sendo parâmetros importantes para avaliar a agressividade das neoplasias vesicais (van Velthoven *et al.*, 1995; Nanning *et al.*, 1997). A fracção de células com teor de ADN >9c representa núcleos aneuplóides particularmente aberrantes, com conteúdo de ADN muito elevado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em frequências absolutas e em percentagens. A comparação entre as variáveis categóricas estudadas foi realizada através do método do Qui-Quadrado e do teste exacto de Fisher. As variáveis numéricas foram estudadas com aplicação do método Kruskal-Wallis e Wilcoxon. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

As neoplasias vesicais em estudo eram provenientes de bovinos principalmente de raça Frísia, que manifestavam sintomatologia clínica de Hematúria Enzootica crónica.

EXAME MACROSCÓPICO

As neoplasias apresentavam um padrão exofítico ou endofítico, variando de pequenas lesões solitárias a neoplasias de grandes dimensões e/ou múltiplas.

As lesões exofíticas, de morfologia papilar, eram frequentemente multifocais e variavam de pequenas áreas com 1,0 mm a lesões exuberantes com 8,0 cm de diâmetro. Apresentavam uma coloração pálida, por vezes acinzentada ou avermelhada e formavam estruturas vegetantes com aspecto de couve-flor, friáveis, que se destacavam facilmente da parede vesical.

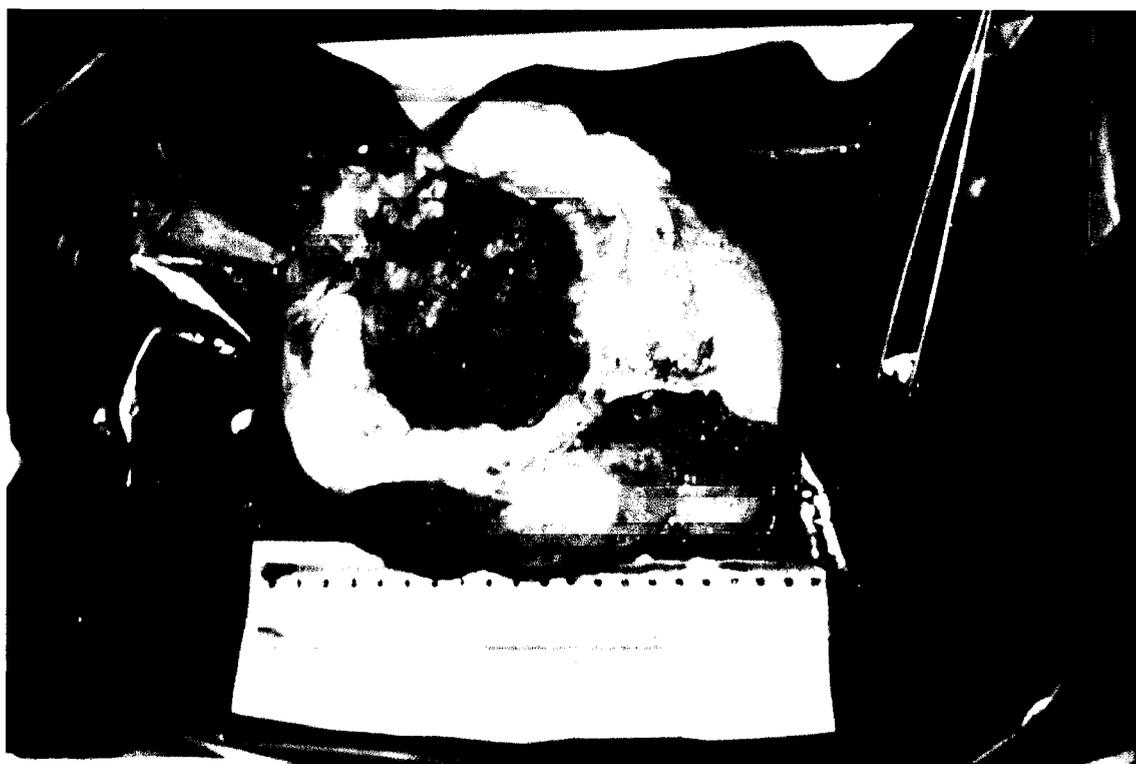


Fig. 1 - Formação exofítica, irregular, na parede vesical.

As lesões endofíticas apresentavam um aspecto sésil ou nodular por vezes formando estruturas globosas. Ao corte verificou-se serem constituídas por tecidos branco-acinzentados de aspecto sólido que infiltravam a parede vesical. No seio do parênquima tumoral observavam-se frequentemente áreas necrótico-hemorrágicas.

A mucosa vesical adjacente às neoplasias apresentava-se irregular e espessada, por vezes com pequenas vesículas contendo material mucinoso, claro e hemorragias petequiais. Por vezes ocorria espessamento e inflamação difusas de toda a parede vesical.

EXAME MICROSCÓPICO

As neoplasias uroteliais foram classificadas de acordo com a sua diferenciação histológica em neoplasias de células transicionais, epidermóides, carcinomas de padrão bifásico, adenocarcinomas e neoplasias indiferenciadas. As neoplasias observadas pertenciam aos tipos histológicos sumariados na tabela 3.

Tabela 3 - Classificação histológica das neoplasias uroteliais observadas.

Tipo neoplásico:	n (%)
Transicional	
Papilar clássico	19 (34,5)
Papilar invertido	16 (29,1)
Nodular ou de padrão misto	12 (21,8)
Espinocelular	0 (0,0)
Adenocarcinoma	2 (3,6)
Carcinomas bifásicos*	5 (9,1)
Tumores indiferenciados	1 (1,8)
Total	55 (100,0)

(*Carcinoma com coexistência de áreas transicionais e áreas de tipo adenocarcinoma)

A multifocalidade foi um achado comum, estando presente em 31 (56,4%) neoplasias da totalidade da amostra. Da série de neoplasias transicionais, 26 (55,3%) coexistiam com neoplasias do mesmo tipo histológico e 17 (36,2%) coexistiam com neoplasias conjuntivas de tipo vascular.

1. NEOPLASIAS TRANSICIONAIS

As neoplasias transicionais apresentaram predominantemente padrão exofítico, papilar (n=35; 74,5%) sob a forma de projecções digitiformes por vezes ramificadas, constituídas por um eixo conjuntivo fibrovascular revestido por urotélio com atipia citológica variável. Dez (21,3%) neoplasias apresentaram crescimento não papilar (nodular), sob a forma de cordões celulares que invadem a parede vesical de forma mais ou menos extensa e 2 (4,3%) neoplasias apresentaram padrão de crescimento misto, coexistindo áreas de crescimento papilar com áreas de padrão endofítico, com predomínio deste último padrão morfológico. Todas as neoplasias apresentaram um grau de atipia citológica incompatível com o diagnóstico de papiloma.

Neste estudo verificámos que as neoplasias uroteliais apresentavam uma grande capacidade de diferenciação multidireccional; observámos múltiplos fenótipos com marcada heterogeneidade relativamente ao padrão de crescimento (áreas papilares clássicas coexistindo com áreas de crescimento invertido ou áreas sólidas), ao grau de atipia citológica, à presença de diferenciação glandular, à proliferação celular e mesmo reactividade para certos marcadores de imunocitoquímica.

1.1. PADRÃO ARQUITECTURAL

Carcinomas uroteliais de padrão papilar

Os carcinomas de padrão arquitectural papilar (n=35) apresentavam 2 fenótipos morfológicos distintos: padrão papilar clássico e padrão papilar invertido.

As neoplasias de padrão papilar clássico (n=19; 54,2%) caracterizaram-se por apresentar papilas de dimensões variáveis, ramificadas, finas ou espessas formando áreas de crescimento sólido. Uma das neoplasias apresentava aspecto viloso.

O urotélio de revestimento das papilas apresentava atipia celular escassa. Observou-se com frequência espessamento epitelial mas sem grandes alterações da arquitectura, ocorrendo diferenciação apical com aparecimento de células em “umbrella”. As células mantinham a polaridade celular e nuclear ou esta era pouco alterada, os núcleos eram monomórficos, com padrão de cromatina homogéneo e sem nucléolo proeminente; as mitoses eram raras e basais, sem atipias. Apenas 2 neoplasias evidenciaram atipia citológica marcada. Frequentemente observou-se focos de crescimento invertido (42,1%) e áreas de diferenciação glandular

(84,2%). A maioria das neoplasias não apresentou comportamento invasor e apenas 2 neoplasias infiltraram o córion. Duas neoplasias apresentaram atipia colocítica.

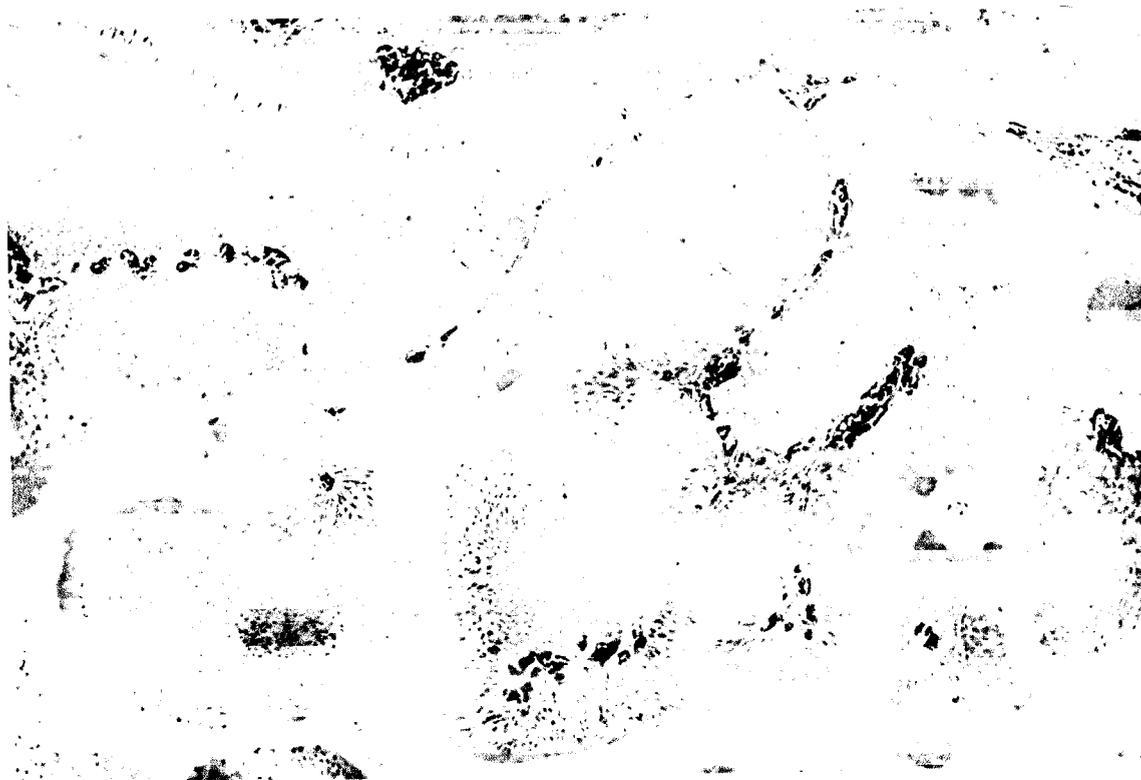


Fig. 2 - Carcinoma de padrão papilar clássico (H&E, 100x).

As neoplasias de padrão invertido corresponderam a 45,7% (n=16) das neoplasias de crescimento papilar; apresentaram uma morfologia similar à dos papilomas invertidos mas com um grau de atipia citológica incompatível com diagnóstico de neoplasia benigna. Caracterizaram-se por apresentar papilas revestidas por urotélio do qual pareciam emanar cordões, ninhos ou trabéculas anastomozadas de células com crescimento endofítico e atipia citológica moderada a elevada. As mitoses em geral pouco frequentes, não se restringiam à camada basal e o estroma era geralmente abundante, apresentando-se hipoplásico nas áreas de crescimento sólido. Em 12 neoplasias (75%) observou-se diferenciação glandular no centro dos cordões celulares, com o aparecimento de espaços císticos contendo material mucinoso. O comportamento invasor foi observado em 81,5% carcinomas, 18,8% das quais invadiram a camada muscular própria. Necrose focal ou de células isoladas foram fenômenos frequentemente observados (43,8%).



Fig. 3 - Carcinoma de padrão papilar invertido (H&E, 100x).

Carcinomas uroteliais de padrão nodular e misto

Estas neoplasias (n=12) apresentaram morfologia muito variável, observando-se lesões ulceradas e infiltrativas. Apresentaram acentuada anisocitose e anisocariose, núcleos grandes com marcada heterocromasia e nucléolos variáveis em número e tamanho. Todos os carcinomas apresentaram comportamento invasor e 83,3% invadiram a camada muscular própria; as células invadem a parede vesical em ninhos e trabéculas irregulares ou isoladamente, desencadeando uma reação estromal desmoplásica e por vezes mixóide. As figuras mitóticas eram comuns com inúmeras formas atípicas. A maioria das neoplasias (91,7%) apresentavam focos de necrose.

Neste estudo observámos carcinomas transicionais de padrão clássico (constituídos por células com características citológicas tipicamente uroteliais) e carcinomas com áreas mais ou menos extensas de diferenciação glandular. As áreas glandulares foram observadas em 33 (70,2%) neoplasias transicionais e consistiam em estruturas tubulares ou císticas contendo material mucinoso, revestidas por células cúbicas ou colunares, por vezes mucossecretoras; frequentemente observou-se acumulação de muco em glóbulos citoplasmáticos. Cinco neoplasias apresentaram formações glandulares de tipo intestinal.



Fig. 4 - Carcinoma de padrão arquitetural nodular (H&E, 100x).

1.2. GRAU NUCLEAR

As lesões malignas foram subdivididas em duas classes, de acordo com o grau de atipia nuclear e frequência mitótica relativamente ao urotélio não neoplásico, parâmetros cujo valor prognóstico tem sido referido em vários carcinomas.

A classificação foi estabelecida em função dos parâmetros sumariados na Tabela 4.

Com esta classificação tentámos obter duas classes neoplásicas com características fenotípicas e biológicas distintas, evitando simultaneamente obter um grupo heterogéneo como o grupo de carcinomas Grau II da classificação da OMS para neoplasias vesicais dos animais domésticos (1974).

Tabela 4 - Classificação do Grau Nuclear.

Pâmetros	Baixo Grau	Alto Grau
Pleomorfismo nuclear	Pouco marcado. Núcleos pequenos, redondos ou ovais, monomórficos	Moderado a acentuado. Núcleos bizarros
Relação núcleo:citoplasma	Pouco alterada	Variável, mas geralmente aumentada
Heterocromasia	Ausente ou pouco marcada	Acentuada
Polaridade nuclear	Mantida ou ligeiramente alterada	Perda de polaridade evidente
Nucléolo	Ausente ou pequeno	Proeminente. Variação de número e tamanho
Padrão de cromatina	Normal ou finamente granular	Grumosa, com distribuição irregular
Regularidade nuclear	Núcleos regulares ou com alterações subtis	Núcleos angulosos e irregulares
Mitoses	Raras, típicas e geralmente basais	Comuns e atípicas.



Fig. 5 - Carcinoma de Baixo Grau: núcleos monomórficos com polaridade celular e nuclear mantida (H&E, 200x).

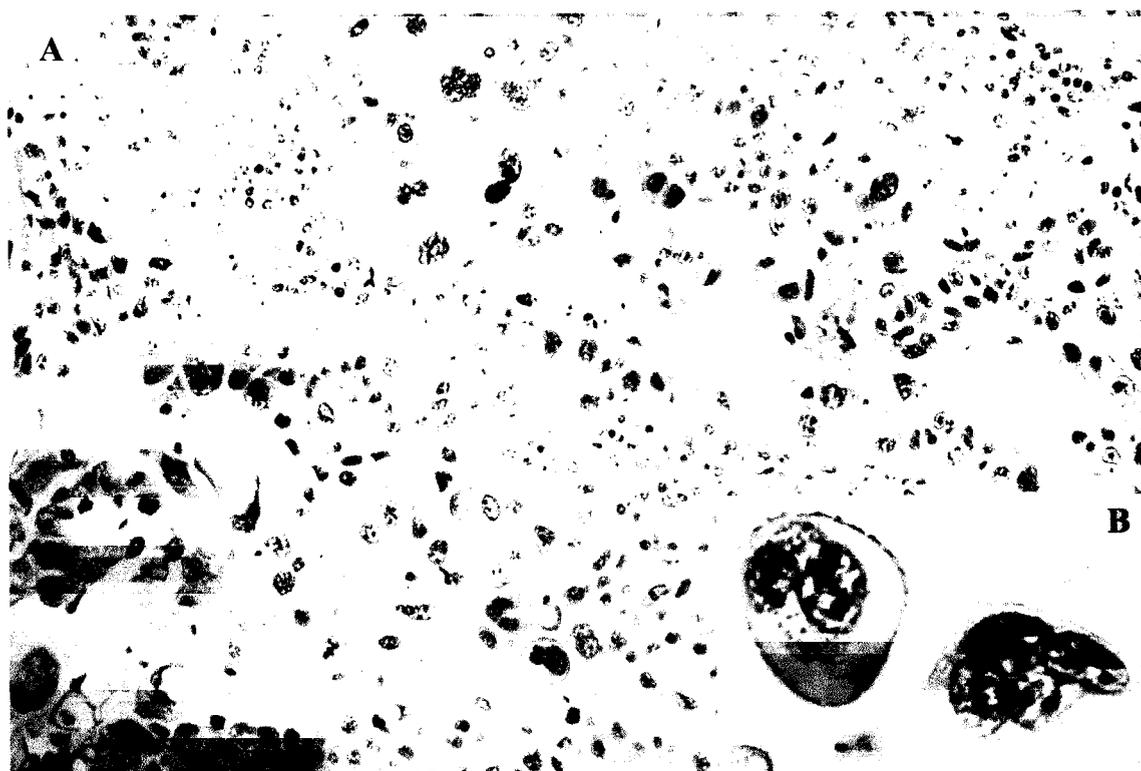


Fig. 6 - Carcinoma papilar invertido de Alto Grau: núcleos pleomórficos, bizarros, com heterocromasia marcada e cromatina grumosa (H&E, A: 200x, B: 1000x).

1.2.1 ASSOCIAÇÃO ENTRE O GRAU NUCLEAR E OS PARÂMETROS PATOLÓGICOS

As frequências absolutas e relativas observadas para cada uma das variáveis patológicas em estudo encontram-se discriminadas na Tabela 5 (em Anexos).

As neoplasias de baixo grau corresponderam a 55,3% (n=26) da série de carcinomas transicionais em estudo, enquanto as neoplasias de alto grau corresponderam a 44,7% (n=21). A multiplicidade ocorreu nos dois grupos, sendo mais comum nas neoplasias de baixo grau (n=16), embora esta diferença não tenha sido significativa. O mesmo se verificou relativamente à coexistência com neoplasias de tipo vascular.

Padrão arquitetural

Quanto ao padrão morfológico verificou-se que todos os carcinomas de baixo grau apresentaram padrão papilar, enquanto os carcinomas de alto grau apresentavam crescimento predominantemente nodular e misto (Tabela 6). Gostariamos de salientar que das 9 neoplasias papilares de alto grau, 7 apresentavam padrão papilar invertido.

Tabela 6 - Associação entre o padrão arquitetural e o grau neoplásico.

Padrão arquitetural	Carcinomas Baixo Grau n (%)	Carcinomas Alto Grau n (%)	p
Papilar	26 (100,0)	9 (42,9)	p<0,0001
Nodular	0 (0,0)	10 (47,6)	
Misto	0 (0,0)	2 (9,6)	

As neoplasias papilares de baixo grau apresentaram atipia citológica suave ou moderada e as células possuíam características citológicas idênticas ao urotélio não neoplásico. Não se observaram elementos celulares bizarros e frequentemente ocorria diferenciação apical com aparecimento de células em “umbrella”.

As neoplasias de alto grau de morfologia papilar, nodular e de padrão misto apresentaram populações celulares menos diferenciadas, com pleomorfismo celular e nuclear marcado, nucléolos proeminentes, por vezes com aparecimento de células bizarras e multinucleadas.

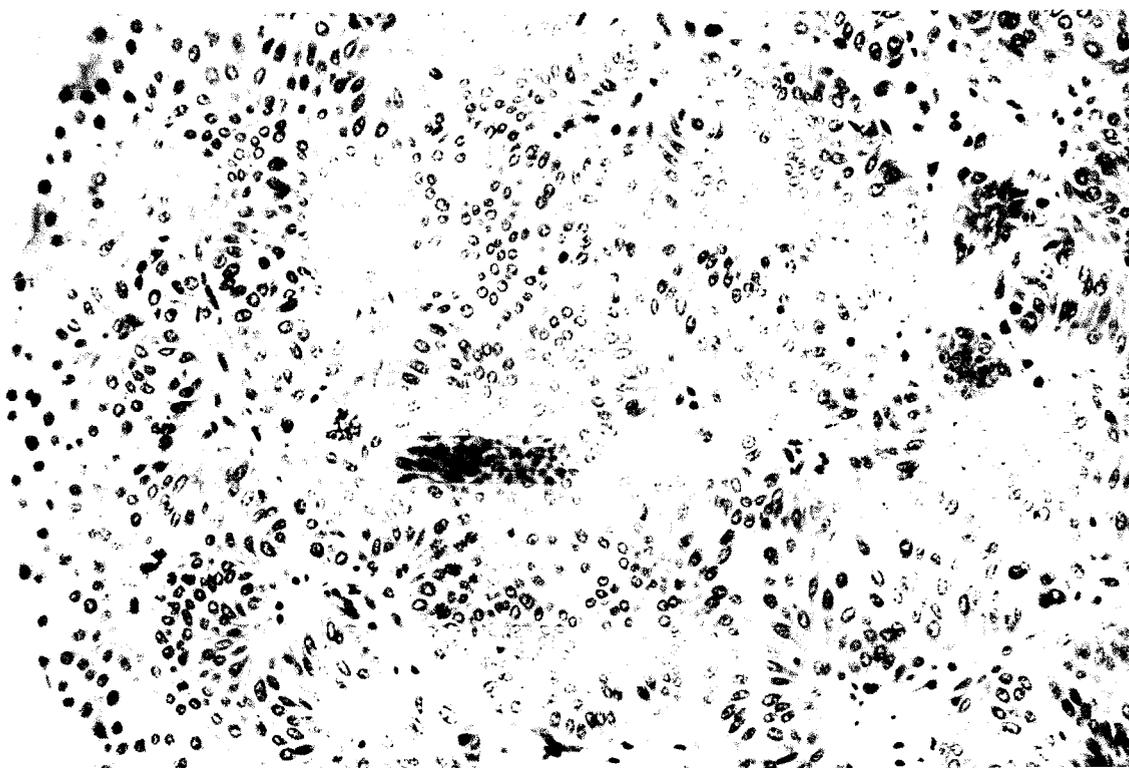


Fig. 7 - Carcinoma de Baixo Grau de padrão papilar invertido (H&E, 200x).

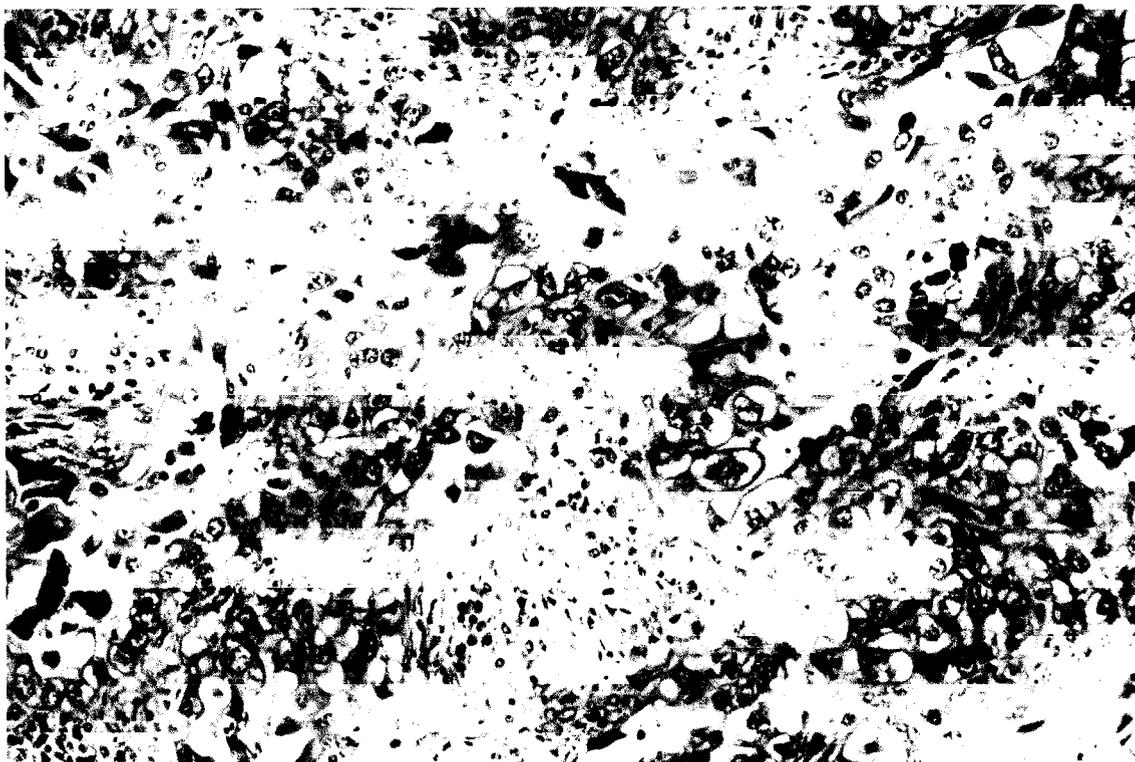


Fig. 8 - Carcinoma de Alto Grau evidenciando desorganização arquitetural e necrose de células isoladas (H&E, 200x).

Necrose

A observação de focos de necrose ocorreu em 85,7% (n=18) das neoplasias de alto grau, mas foi significativamente menos comum nas neoplasias papilares de baixo grau.

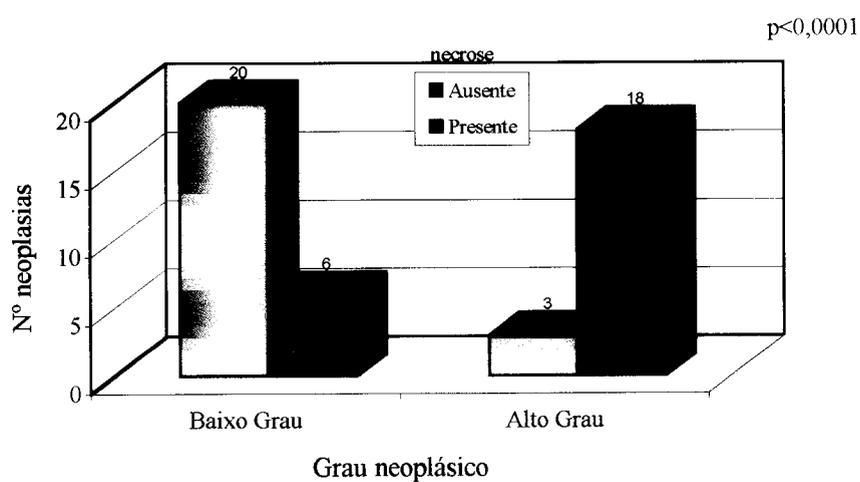


Fig. 9 - Associação entre necrose e o grau neoplásico.

A necrose ocorreu sob a forma de morte de células isoladas, frequentemente no centro de ninhos celulares de invasão mimetizando estruturas glandulares, ou sob a forma de áreas necrotizantes extensas no parênquima neoplásico.

Diferenciação glandular e epidermóide

A ocorrência de diferenciação epidermóide foi um evento raro. Observou-se apenas numa neoplasia nodular de alto grau com invasão profunda da parede vesical e caracterizou-se por queratinização celular com acumulação focal de queratina laminada (pérola de queratina).

As áreas de diferenciação glandular, ocorreram em ambos os grupos neoplásicos mas tiveram maior representatividade nos carcinomas papilares de baixo grau (76,9%), grupo neoplásico que também apresentou com maior frequência áreas glandulares de tipo intestinal.

O tipo de mucopolissacarídeos presente foi evidenciado pela técnica de coloração conjunta de PAS e Azul de Alciano, após o tratamento proteolítico das preparações histológicas com uma solução de diástase. Esta técnica permite evidenciar simultaneamente mucopolissacarídeos neutros (que coram de púrpura pela reação do Ácido Periódico de Schiff) e mucopolissacarídeos ácidos (que coram de azul turquesa pelo Azul de Alciano). Na totalidade da série de neoplasias transicionais observou-se uma produção predominante de mucinas neutras (38,3%) seguidas de produção conjunta de muco neutro e ácido (27,7%).

Estroma

A técnica de PAS-Azul Alciano permitiu ainda confirmar alterações na composição da substância fundamental amorfa do estroma neoplásico, sugeridas pela observação com coloração de rotina de áreas de aspecto mixóide. Estas alterações, associadas a um aumento de mucinas ácidas no estroma, estiveram presentes em 8 (38,1%) dos carcinomas de alto grau. Em 11 (52,4%) destas lesões observou-se também estroma desmoplásico. As alterações estromais ocorreram quase exclusivamente em carcinomas que infiltravam profundamente a parede vesical. Um carcinoma de alto grau apresentou foco de metaplasia óssea do estroma.

A presença de infiltrado inflamatório no estroma foi comum, em particular por células da linha linfoplasmocitária; ocasionalmente observou-se também a presença de eosinófilos.

Invasão e metastização

O comportamento invasor ocorreu em 27 (57,4%) neoplasias uroteliais, sendo mais comum em carcinomas de alto grau (95,2%), grupo que apresentou frequentemente invasão da camada muscular própria (52,4%).

Os carcinomas menos invasores pertenciam ao grupo carcinomas de baixo grau. O crescimento infiltrativo, presente em 7 carcinomas (26,9%) limitou-se a imagens de micro-invasão do córion sob a forma de pequenos ninhos celulares de limites mal definidos, com citoplasma abundante e núcleo pleomórfico, irregular. É de salientar que destas neoplasias apenas 2 apresentavam padrão arquitetural papilar clássico. O comportamento invasor nestes dois grupos neoplásicos foi significativamente diferente ($p < 0,0001$), mas esta diferença não foi significativa quando avaliámos a profundidade de invasão da parede vesical.

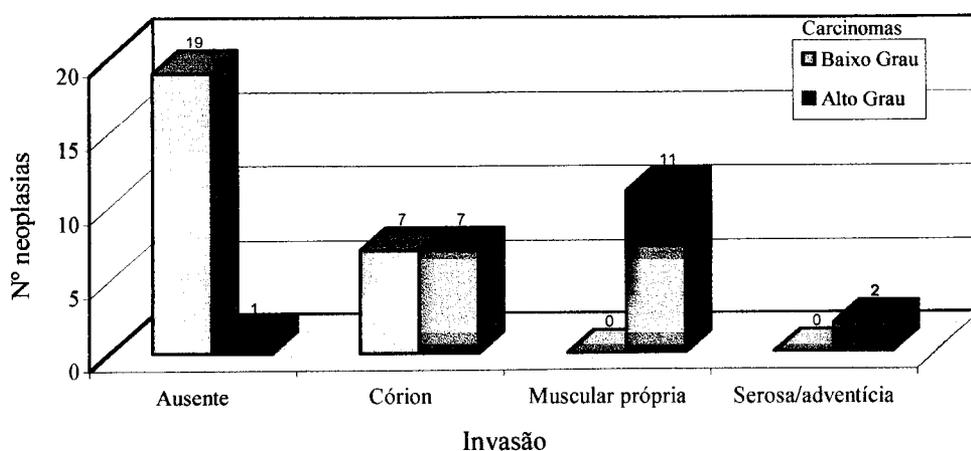


Fig. 10 - Invasão da parede vesical.

O fenótipo invasor ocorreu na totalidade dos carcinomas de padrão não papilar e em apenas 42,9% ($n=15$) dos carcinomas papilares ($p=0,002$). Observou-se ainda associação entre a invasão e a necrose ($p=0,028$), mas não se observou associação com a metastização.

A permeação vascular ocorreu em 10 (47,6%) neoplasias transicionais e exclusivamente em carcinomas de alto grau ($p < 0,0001$), com padrão arquitetural nodular com excepção de 2 carcinomas de padrão papilar invertido. Para facilitar a detecção de êmbolos neoplásicos evitando a valorização de eventuais artefactos associados à retracção do estroma, recorreu-se à técnica de histoquímica de orceína; esta evidenciava as fibras elásticas das paredes vasculares corando-as de vermelho escuro a castanho.

A informação sobre a ocorrência de metástases detectadas no exame *post-mortem* das carcaças no matadouro foi escassa. Apenas observámos 2 carcinomas com metastização, uma apresentando metástases ganglionares, outra metástases ganglionares e hepáticas. A metastização ocorreu exclusivamente em neoplasias nodulares de alto grau, com elevada anaplasia, comportamento infiltrativo e índices de proliferação altos.



Fig. 11 - Carcinoma de alto grau com invasão do córion (H&E, 100x).

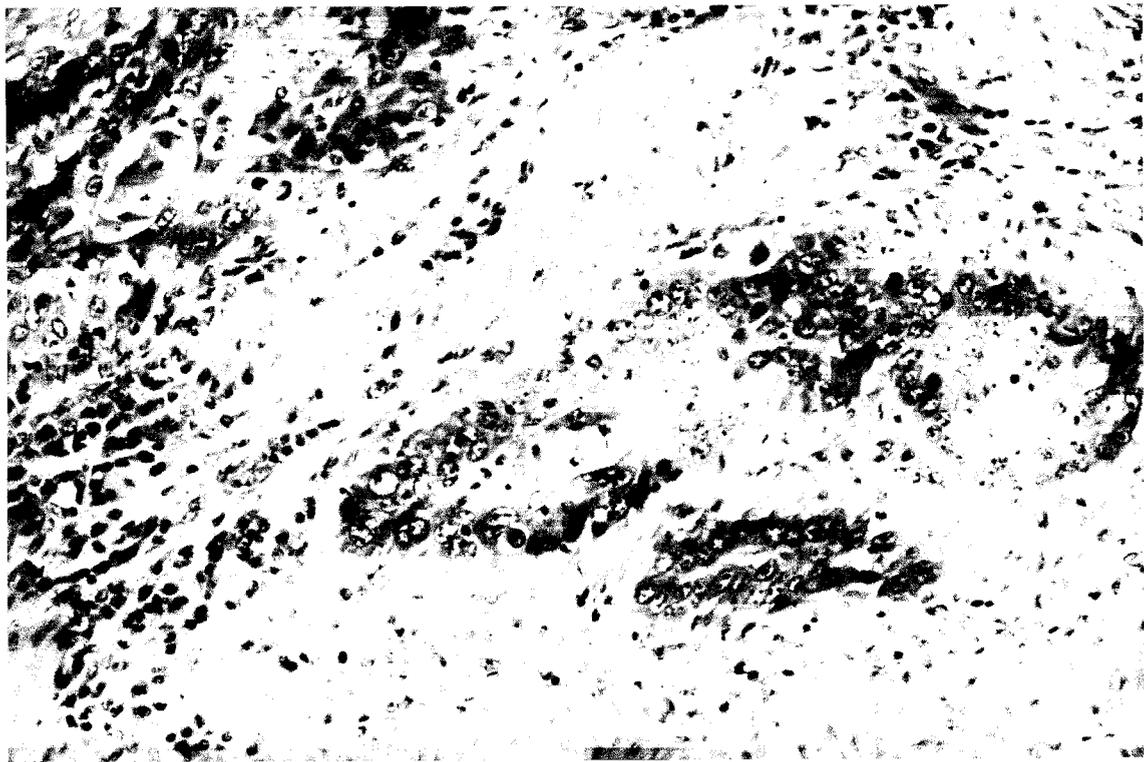


Fig. 12 - Carcinoma de alto grau com invasão da camada muscular própria (H&E, 200x).

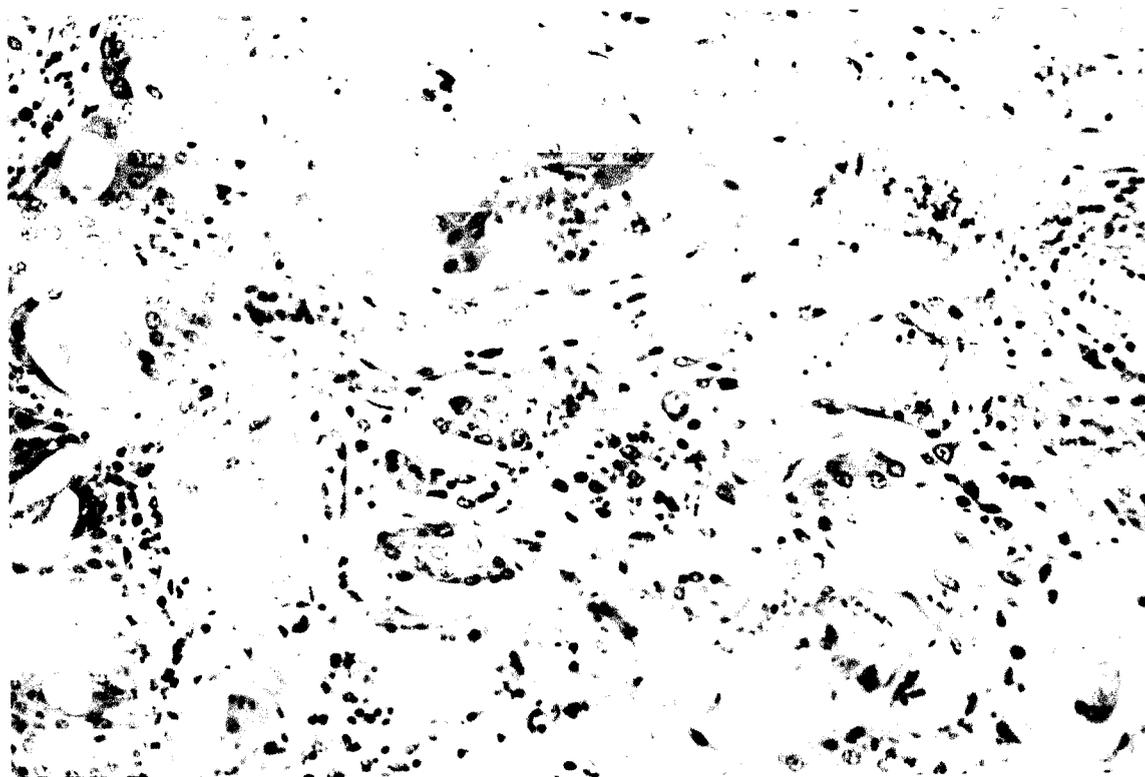


Fig. 13 - Carcinoma de alto grau com êmbolos vasculares (H&E, 200x).

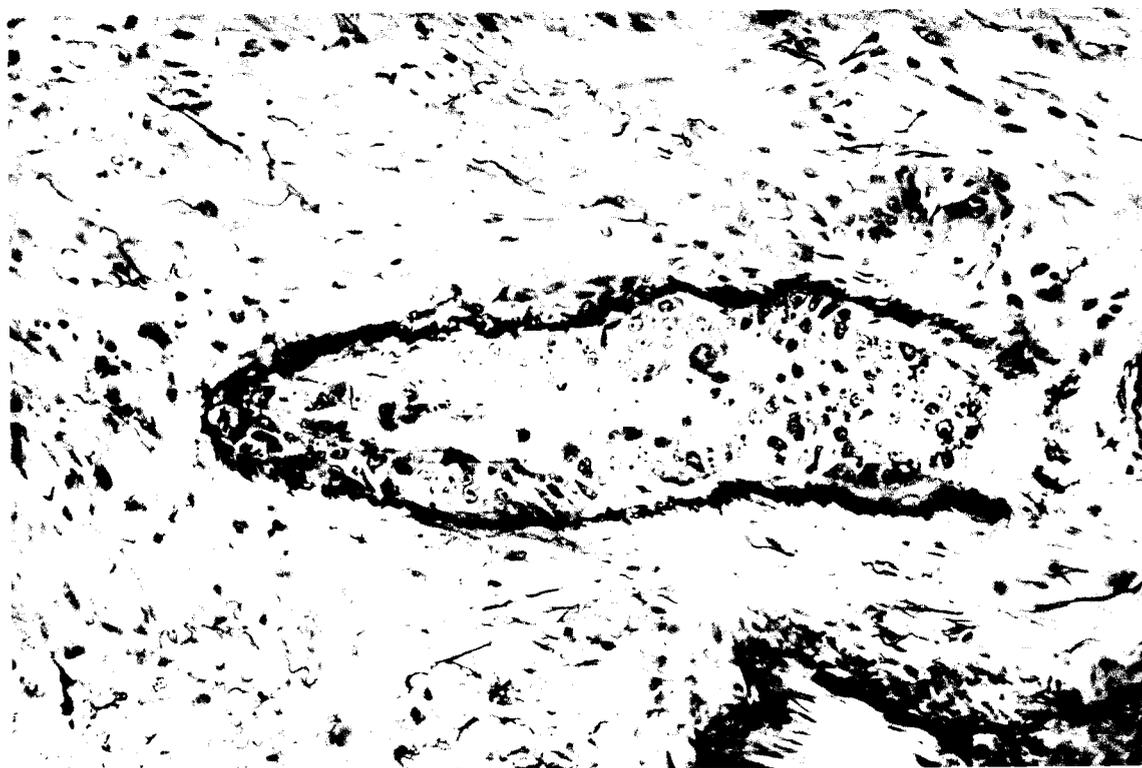


Fig. 14 - Vaso contendo células embólicas: fibras elásticas da parede vascular evidenciadas com a técnica de Orceína (200x).

1.2.2. ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO

Os carcinomas transicionais apresentaram um valor mediano de células em mitose de 0,5% apesar dos valores deste índice de proliferação celular apresentarem uma variação relativamente acentuada (mínimo 0,0%, máximo 12,8%).

Os carcinomas papilares de baixo grau apresentaram índice mitótico baixo, por vezes menor que o do urotélio não neoplásico; as mitoses eram predominantemente basais e típicas. Nos carcinomas papilares e nodulares de alto grau o índice mitótico foi mais elevado e apresentava intervalos de variação amplos. Observaram-se frequentemente mitoses nas camadas média e apical, por vezes atípicas. Estas diferenças apresentaram significado estatístico (Tabela 7).

Tabela 7 - Índice mitótico dos carcinomas transicionais.

Índice mitótico (%)	Carcinomas Baixo grau	Carcinomas Alto Grau	p
Mediana (Min-max)	0,4 0,0-1,8	2,2 0,4-12,8	p<0,0001

Quanto ao marcador de proliferação celular antigénio Ki-67, os carcinomas transicionais apresentaram um valor mediano de células marcadas de 14,8% (mínimo 0,8%, máximo 73,0%). Este valor foi utilizado como “cut-off” de forma a subdividir as neoplasias em duas categorias, com índice de Ki-67 baixo ($\leq 15,0\%$) e alto ($> 15,0\%$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Índice de Ki-67 dos carcinomas transicionais de baixo e alto grau.

Índice de Ki-67	Carcinomas Baixo grau n (%)	Carcinomas Alto Grau n (%)	p
Baixo ($\leq 15,0\%$)	23 (88,5)	1 (4,8)	p<0,0001
Alto ($> 15,0\%$)	3 (11,5)	20 (95,2)	

A maioria dos carcinomas papilares de baixo grau (88,5%) possuía menos de 15,0% das células neoplásicas em replicação (Ki-67 baixo), enquanto 95,2% dos carcinomas de alto grau apresentaram índice de Ki-67 alto, valor significativamente superior.

Gostaríamos ainda de referir que se observaram associações estatisticamente significativas entre o índice de Ki-67 e o índice mitótico ($p < 0,0001$), o comportamento invasor ($p < 0,0001$), a permeação vascular ($p = 0,0002$) e as áreas de necrose no seio da massa neoplásica ($p < 0,0001$). É ainda de salientar que as neoplasias que invadiam o córion possuíam valores de Ki-67 altos em 64,3% dos casos e destas apenas 2 eram neoplasias de baixo grau de padrão papilar convencional; todas as neoplasias que invadiram a camada muscular própria ($n = 11$) e tecidos perivesicais ($n = 2$) apresentaram índices de proliferação altos (entre 22,0 e 73,0%) e 8 destas neoplasias apresentaram êmbolos vasculares.

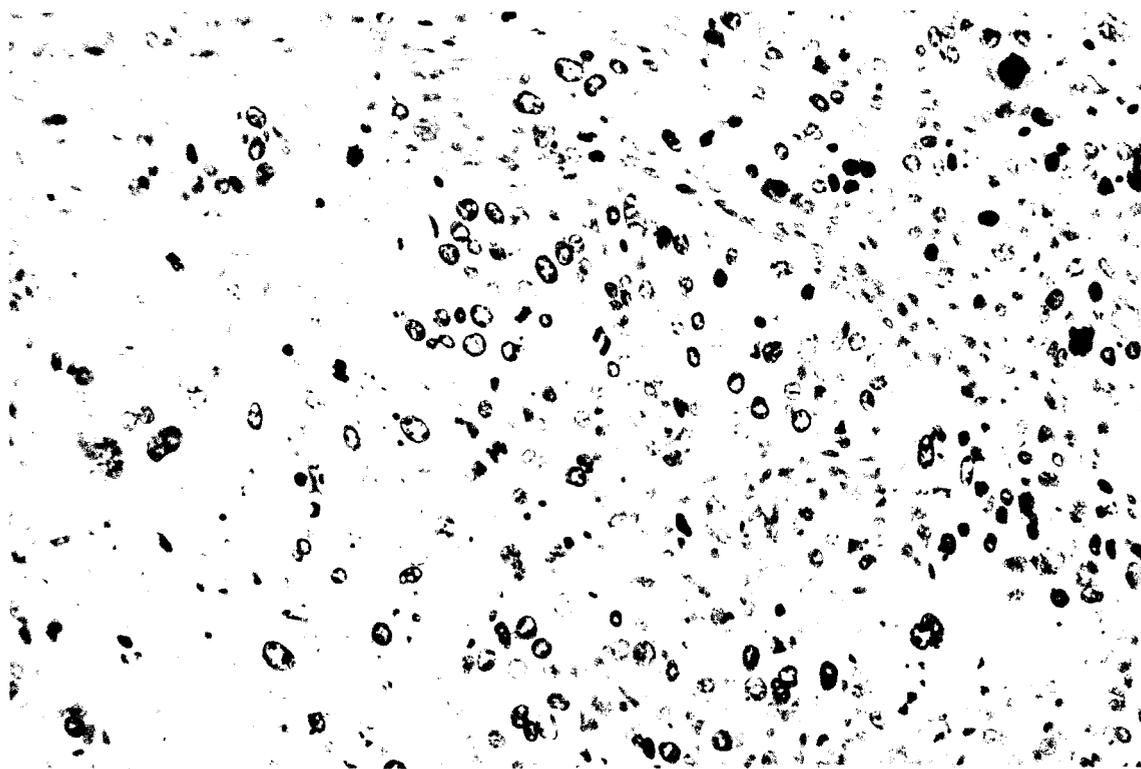


Fig. 15 - Carcinoma de alto grau evidenciando elevada imunoreactividade ao Antígeno Ki-67 (200x).

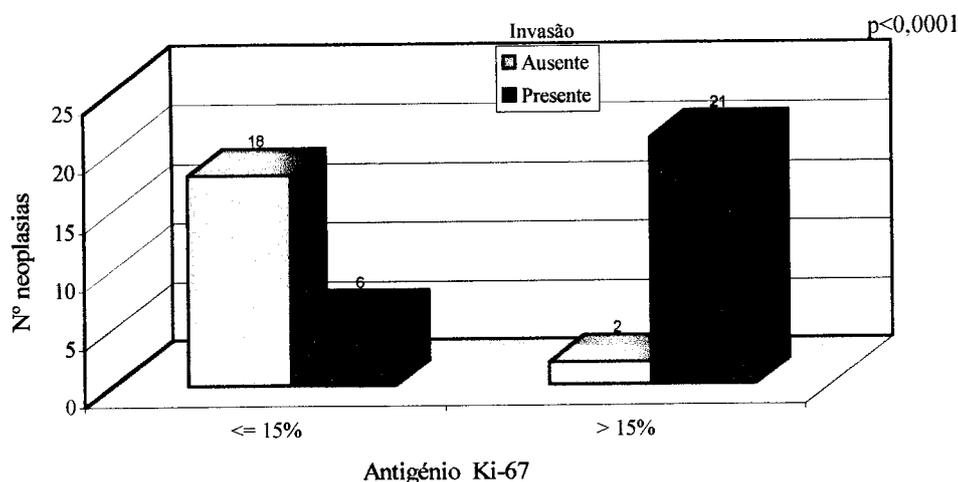


Fig. 16 – Associação entre o Índice de Ki-67 e o comportamento invasor.

1.2.3 CARACTERÍSTICAS IMUNOCITOQUÍMICAS

Os resultados dos estudos realizados encontram-se sumariados na Tabela 9 (em Anexos).

Vimentina

A imuno-expressão desta proteína do citoesqueleto ocorreu em 17 (36,2%) das neoplasias transicionais. A marcação foi observada em 15 (71,4%) dos carcinomas de alto grau de padrão papilar ou nodular e em apenas 2 (7,7%) carcinomas papilares de baixo grau, existindo uma associação estatisticamente significativa entre estes parâmetros ($p < 0,0001$).

A marcação característica ocorreu no citoplasma das células do estroma, tendo também sido observada imuno-expressão na neoplasia, em pequenos grupos celulares ou células isoladas. Não se observou imunoreactividade no urotélio não neoplásico.

A imuno-expressão deste marcador conjuntivo apresentou associação estatística com a invasão da parede vesical ($p < 0,0001$); 84,6% ($n=11$) dos carcinomas que invadiram a camada muscular e tecidos perivesicais apresentaram imunoreactividade à Vimentina evento que também foi observado em alguns êmbolos neoplásicos.

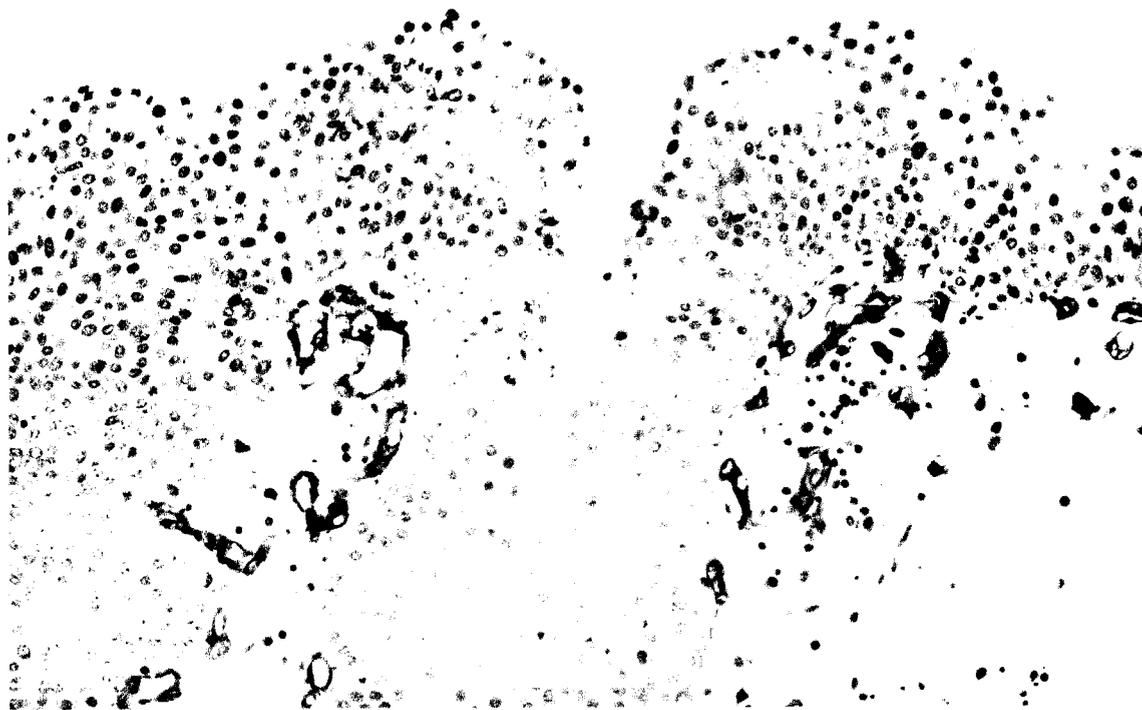


Fig. 17 - Carcinoma papilar invertido de baixo grau evidenciando imunoreactividade à Vimentina (200x).



Fig. 18 - Carcinoma de alto grau, apresentando foco de células com intensa imunomarcção à Vimentina (200x).

Caderina E

A imunomarcção desta molécula de adesão celular revelou-se heterogénea e inconstante, quer no tecido não neoplásico quer na neoplasia, pelo que só se avaliou a sua expressão em 22 neoplasias transicionais. A marcação ocorreu principalmente de forma multifocal, observando-se imuno-expressão difusa em apenas 4 (18,2%) casos; 2 carcinomas (9,1%) foram negativos a este marcador.

A marcação membranar característica não foi observada em nenhuma neoplasia desta série. A imunorreactividade ocorreu predominantemente no citoplasma, de forma difusa ou em grumos (“dott like”), e 90,0% das neoplasias apresentaram marcação citoplasmática com acentuar da expressão na membrana celular, evidenciando-a.

A totalidade dos carcinomas papilares de baixo grau analisados (n=13) e 7 (77,8%) dos carcinomas papilares e nodulares de alto grau foram positivos a este marcador, não se observando diferenças significativas nos dois grupos neoplásicos em estudo. Verificou-se contudo, que muitas neoplasias pouco diferenciadas com crescimento infiltrativo apresentaram imunomarcção citoplasmática a esta glicoproteína membranar.

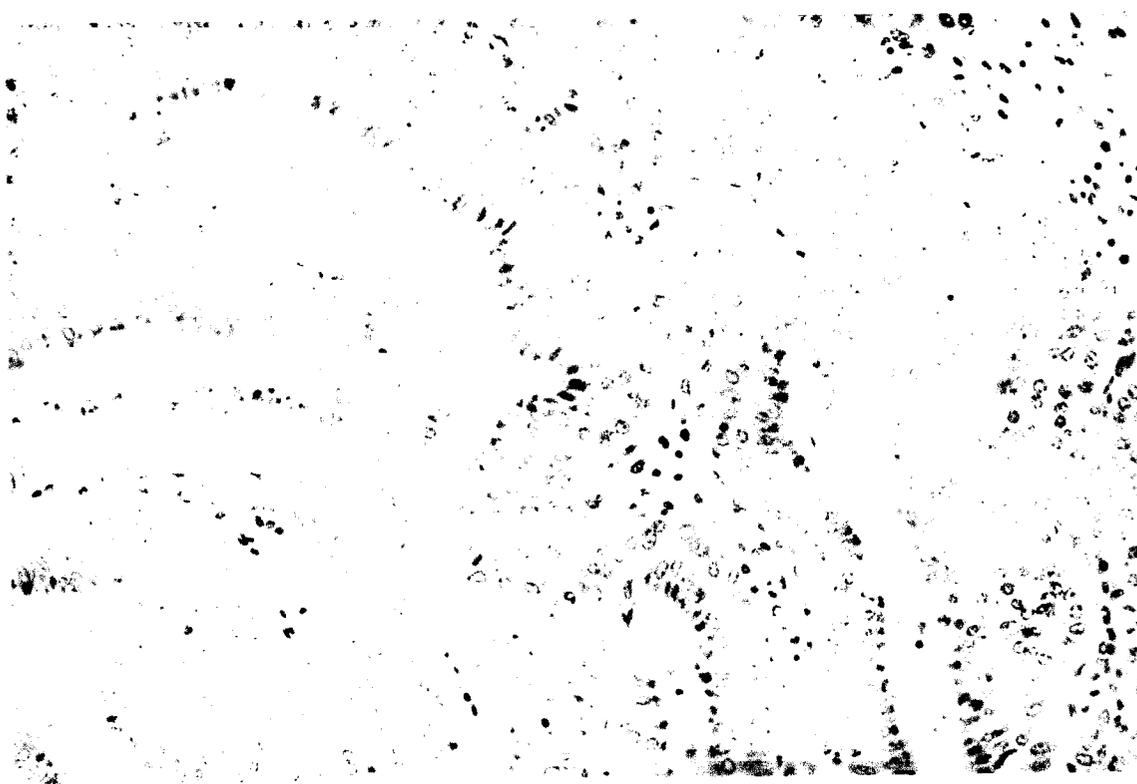


Fig. 19 - Imuno-expressão citoplasmática à Caderina E (200X).

CEA

Relativamente à expressão deste antígeno embrionário, considerou-se como positiva toda a marcação que ocorresse em mais de 10,0% da massa neoplásica. A imunorreactividade ocorreu no citoplasma das células uroteliais, no revestimento apical do urotélio, de áreas glandulares e de vacúolos citoplasmáticos.

Observou-se imunorreactividade ao CEA em 19 (40,4%) das neoplasias transicionais. A expressão ocorreu com maior frequência nos carcinomas de alto grau (n=9; 42,9%), mas esta diferença não atingiu significado estatístico. Das 13 neoplasias papilares e nodulares de alto grau com invasão da camada muscular própria e adventícia, 7 (53,8%) apresentaram positividade ao CEA. A maioria das neoplasias papilares de baixo grau (61,5%) foram negativas a este marcador. A imuno-expressão ocorreu predominantemente no citoplasma dos carcinomas de alto grau enquanto nos carcinomas de baixo grau a marcação verificou-se principalmente no citoplasma e no revestimento apical do urotélio. Os carcinomas com comportamento invasor apresentaram predominantemente imuno-expressão citoplasmática (n=8; 72,7%) enquanto todos os carcinomas não invasores apresentaram marcação no revestimento apical do urotélio, observando-se uma associação estatística significativa entre a invasão e o local de expressão de CEA (p=0,0034).

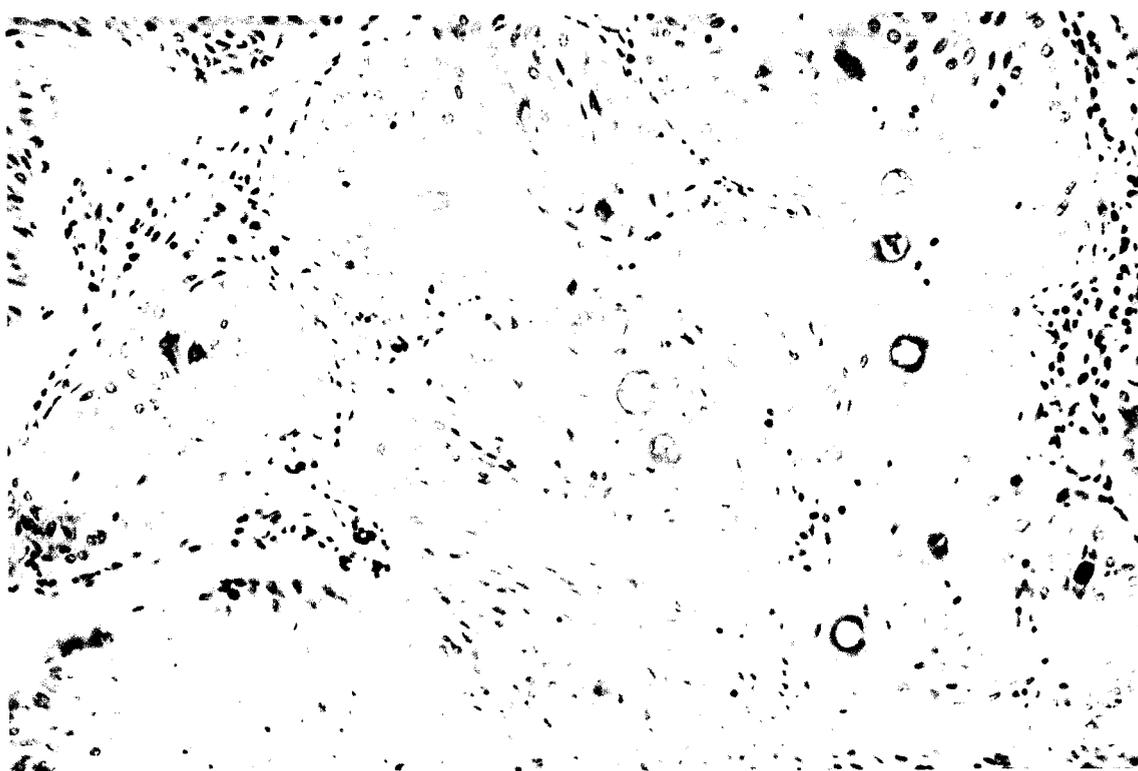


Fig. 20 - CEA: imunorreactividade citoplasmática e no revestimento luminal (200x).



Fig. 21 - CEA: imunoreactividade citoplasmática com acentuar membranar (200x).

Outros marcadores

Proteína p53

As neoplasias vesicais bovinas não apresentaram imunoreactividade nuclear a este marcador, mas esta observou-se em carcinomas epidermóides da terceira pálpebra (controlo positivo) provenientes dos mesmos animais.

p21^{ras}

Não se observou qualquer imunoreactividade a esta proteína.

CD44 e CD44,6

Não se observou imuno-expressão a estas moléculas de adesão nas neoplasias vesicais, mas esta observou-se nas lâminas de controlo positivo de útero de mulher.

2. CARCINOMAS BIFÁSICOS

As neoplasias de padrão bifásico caracterizaram-se por apresentar áreas transicionais associadas a extensas áreas glandulares, superiores a 10% da massa neoplásica. Cinco neoplasias de padrão de crescimento papilar obedeceram a este critério, 4 apresentando padrão clássico e uma padrão invertido.

O componente transicional não apresentou alterações citológicas ou arquiteturais marcadas, com excepção de uma neoplasia que apresentou atipia nuclear marcada, com áreas hiperclulares de crescimento sólido, constituídas por células fusiformes com perda da acidofilia citoplasmática. Relativamente ao crescimento invasor, o componente transicional de 2 carcinomas apresentou invasão superficial do córion, um possuindo padrão papilar invertido e o outro apresentando características de alto grau nuclear.

As mitoses foram no geral pouco frequentes; a mediana do índice mitótico foi similar à do grupo das neoplasias transicionais, ainda que o intervalo de variação tenha sido mais restrito. O valor mediano de antigénio Ki-67 foi também menor que o das neoplasias transicionais puras (Tabela 10).

Tabela 10 - Índice mitótico e de antigénio Ki-67 dos componentes transicional e adenocarcinoma dos carcinomas bifásicos.

Índices de proliferação (%)	Componente transicional	Componente adenocarcinoma
Índice mitótico		
Mediana	0,40	0,00
Mínimo-Máximo	(0,20-0,50)	(0,00-0,18)
Índice de Ki-67		
Mediana	10,40	5,08
Mínimo-Máximo	5,03-19,40	2,6-6,8

O componente adenocarcinoma, caracterizou-se pela formação de estruturas glandulares, tubulares ou áreas císticas, revestidas por células cúbicas ou colunares formando epitélio simples que em 2 casos apresentava diferenciação glandular de tipo cólon. As células, moderada ou bem diferenciadas, apresentaram atipia escassa, mitoses raras e produziam mucinas ácidas e neutras. Duas neoplasias apresentavam células mais atípicas, com núcleos grandes, pleomórficos e nucléolos proeminentes, uma das quais estava associada a grau nuclear alto no componente transicional.

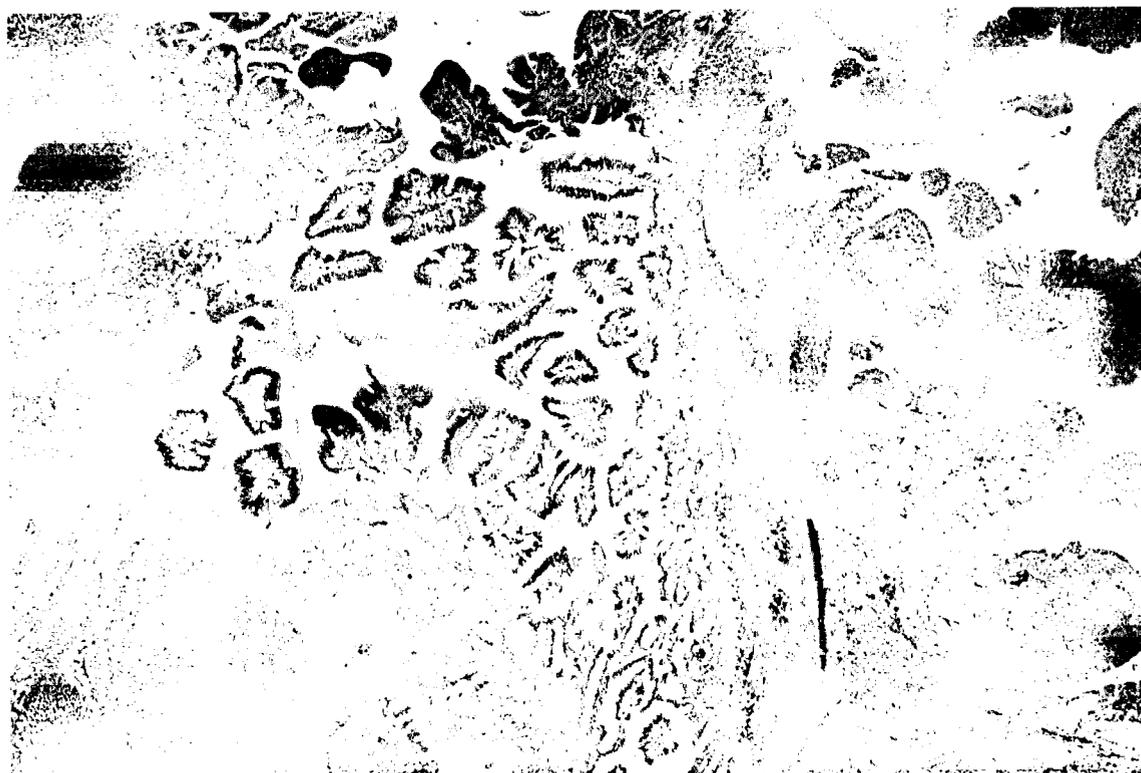


Fig. 22 - Carcinoma bifásico do padrão arquitectural papilar (H&E, 40x).

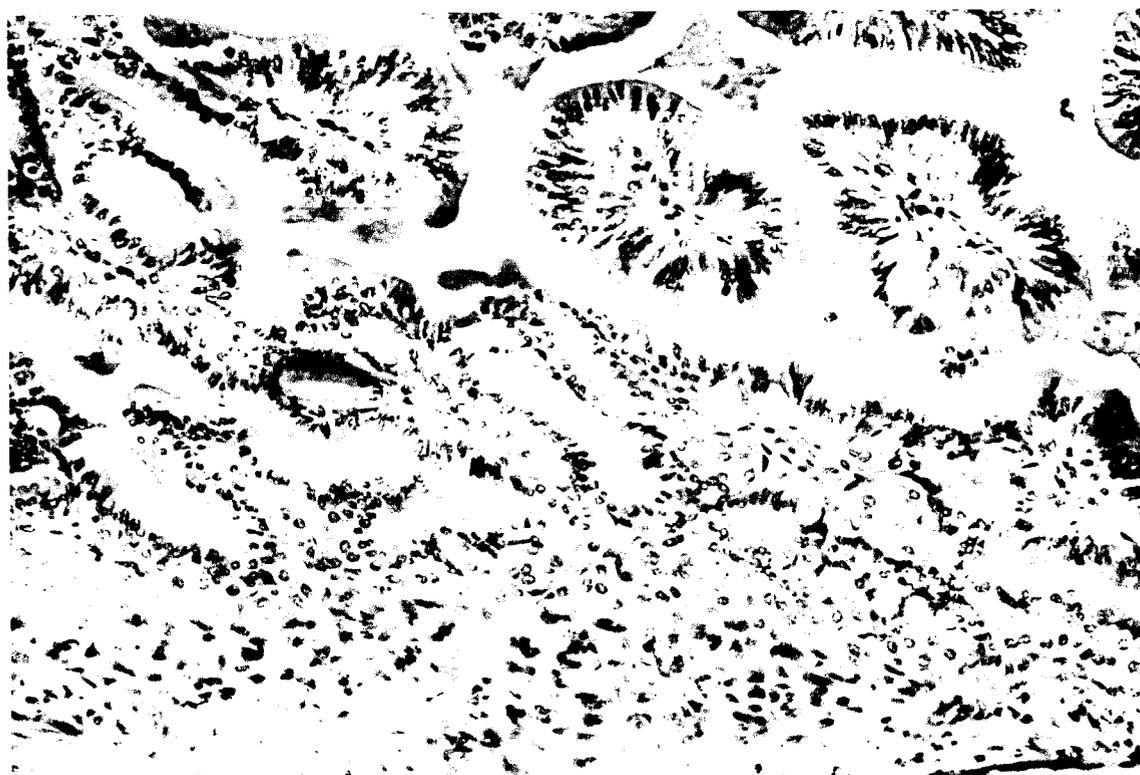


Fig. 23 - Ampliação da neoplasia anterior, evidenciando área de tipo adenocarcinoma (H&E, 200x).



Fig. 24 - Carcinoma bifásico: área de tipo adenocarcinoma com diferenciação glandular de tipo intestinal (H&E, 100x).

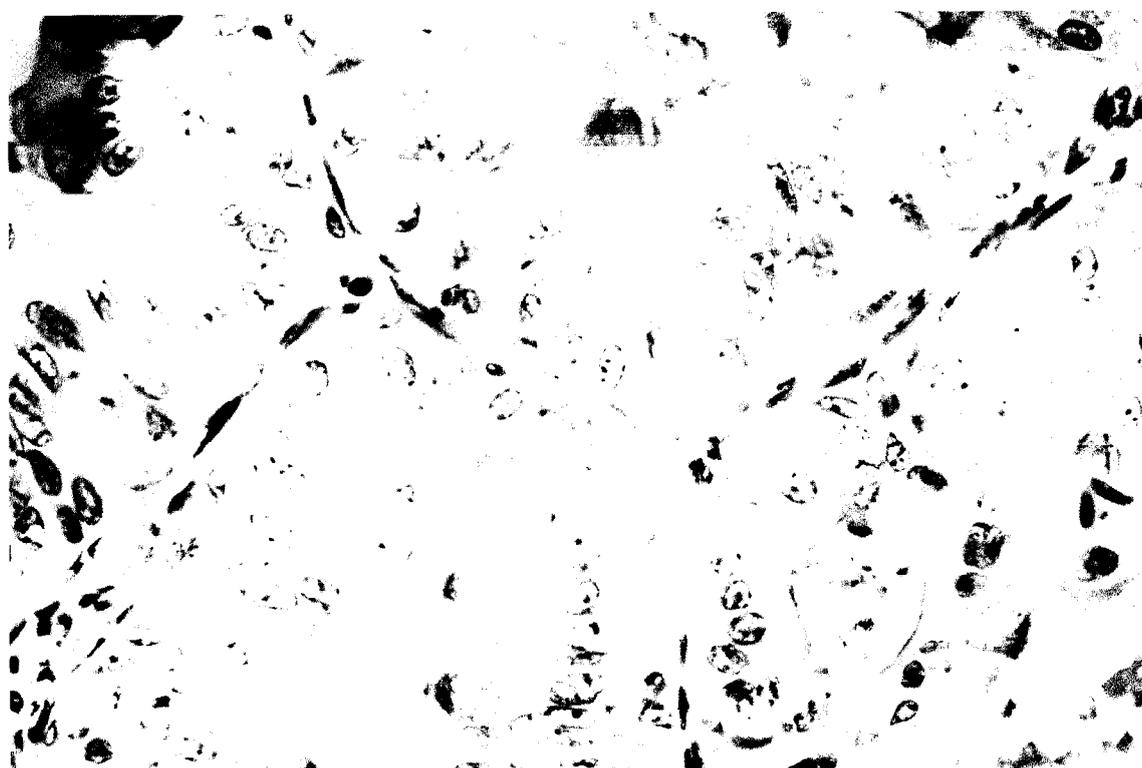


Fig. 25 - Ampliação da imagem anterior (H&E, 1000x).



Fig. 26 - Carcinoma bifásico de padrão arquitetural papilar invertido (H&E, 200x).

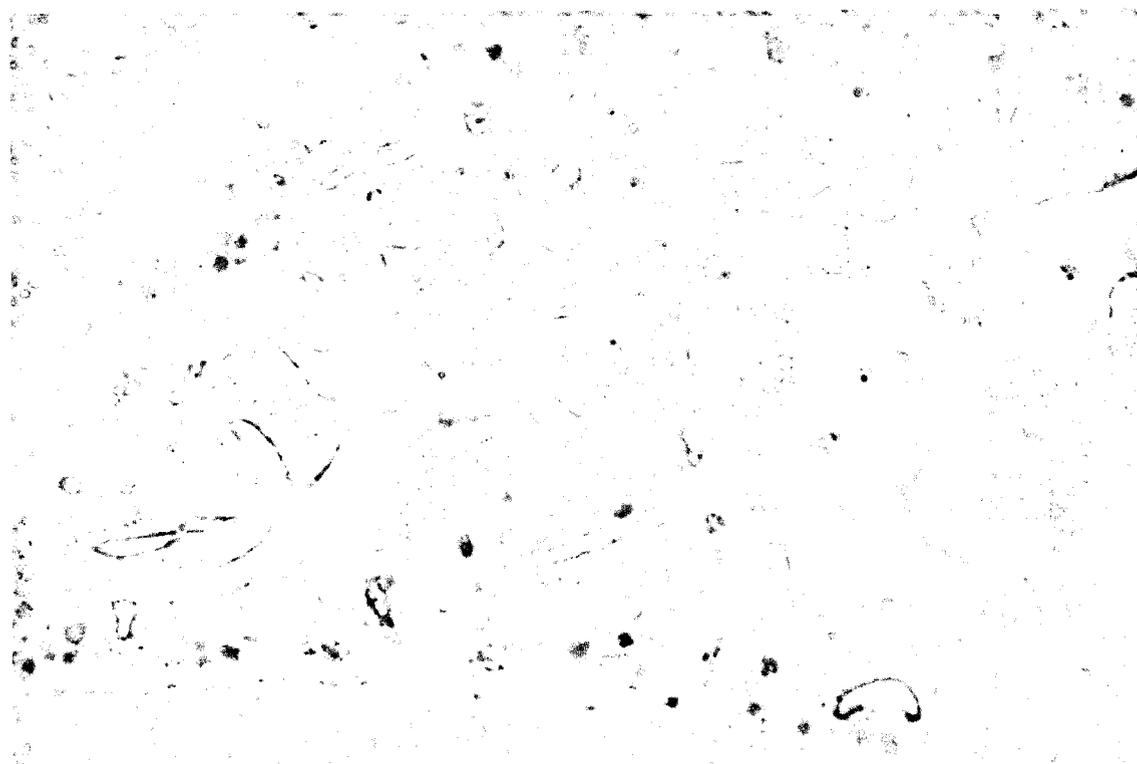


Fig. 27 - Carcinoma bifásico: positividade ao CEA no componente adenocarcinoma (200x).

As células neoplásicas não apresentaram imunoreactividade à Vimentina, mas foram positivas ao CEA. A imunoexpressão desta glicoproteína ocorreu principalmente no componente adenocarcinoma, no citoplasma (padrão “dott-like”) e/ou no revestimento apical das áreas glandulares, de forma difusa ou multifocal. O componente transicional foi positivo em dois casos e sempre de forma focal.

As 3 neoplasias avaliadas quanto à imunoreactividade à Caderina-E apresentaram expressão heterogénea desta proteína, a nível da membrana celular e no citoplasma.

3. ADENOCARCINOMAS

Este grupo incluiu todas as neoplasias que apresentavam predomínio do componente glandular, na ausência ou escassez de características uroteliais. Os dois adenocarcinomas observados caracterizaram-se por apresentar crescimento endofítico, sob a forma de estruturas ductais, tubulares ou cistos contendo muco, que invadiam superficialmente o córion. As células, de núcleo grande e nucléolo proeminente, formavam um epitélio cúbico ou colunar simples com células caliciformes, por vezes originando um epitélio de tipo intestinal.

Uma das neoplasias, de padrão mucinoso, apresentava áreas císticas revestidas por células com atipia escassa, índices mitótico e de Ki-67 baixos e no estroma observaram-se extensas áreas de aspecto mixóide, secundárias a extravasamento de muco por ruptura dos cistos dilatados. As células apresentaram expressão citoplasmática de CEA, Caderina E e Vimentina. O infiltrado celular era abundante, particularmente por células da linha linfoplasmocitária. O outro adenocarcinoma apresentava ulceração da mucosa, necrose de células isoladas, mitoses abundantes e índice de Ki-67 elevado (37,0%), mas as células foram negativas à Vimentina, Caderina E e CEA.



Fig. 28 - Adenocarcinoma com áreas glandulares de tipo intestinal (H&E, 40x).

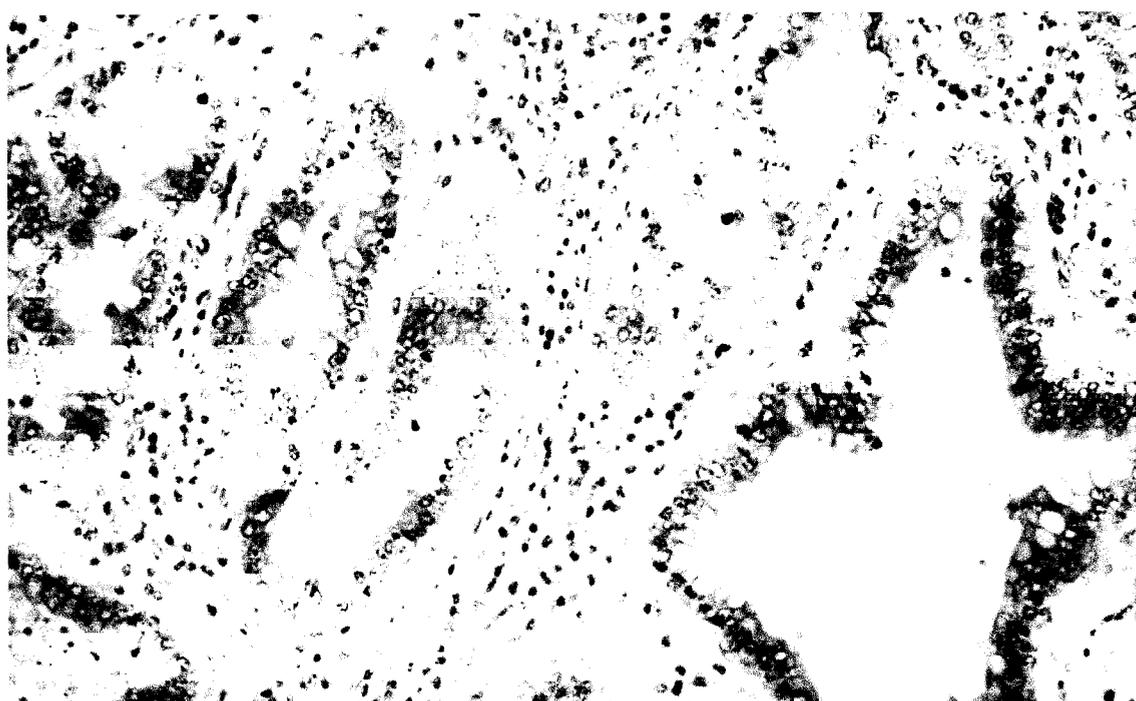


Fig. 29 - Ampliação da neoplasia anterior evidenciando atipia citológica e figuras de mitose (H&E, 200x).

4. CARCINOMAS INDIFERENCIADOS

Este grupo neoplásico caracterizou-se pela presença de células indiferenciadas, de provável origem urotelial, mas sem quaisquer evidências citológicas ou histológicas, de diferenciação urotelial. Observámos apenas um carcinoma indiferenciado com células de citoplasma acidófilo abundante, por vezes vacuolizado, e núcleo grande com nucléolo proeminente e acidófilo. As células eram frequentemente binucleadas ou multinucleadas, bizarras, invadiam a parede vesical isoladamente ou em pequenos ninhos e ocasionalmente formavam pequenas estruturas de tipo glandular contendo mucopolissacarídeos neutros. A neoplasia infiltrava profundamente a parede vesical atingindo a serosa e desencadeava uma reacção estromal desmoplásica e mixóide, por vezes pseudosarcomatosa.

Observaram-se imagens de permeação vascular. Apesar de com a coloração de rotina não se observarem muitas figuras de mitose (índice mitótico de 0,8%), o antígeno Ki-67 permitiu evidenciar que 65,4% das células se encontravam em replicação activa.

As células apresentaram imunexpressão citoplasmática à Panqueratina, à Vimentina, à Caderina E e ao CEA.

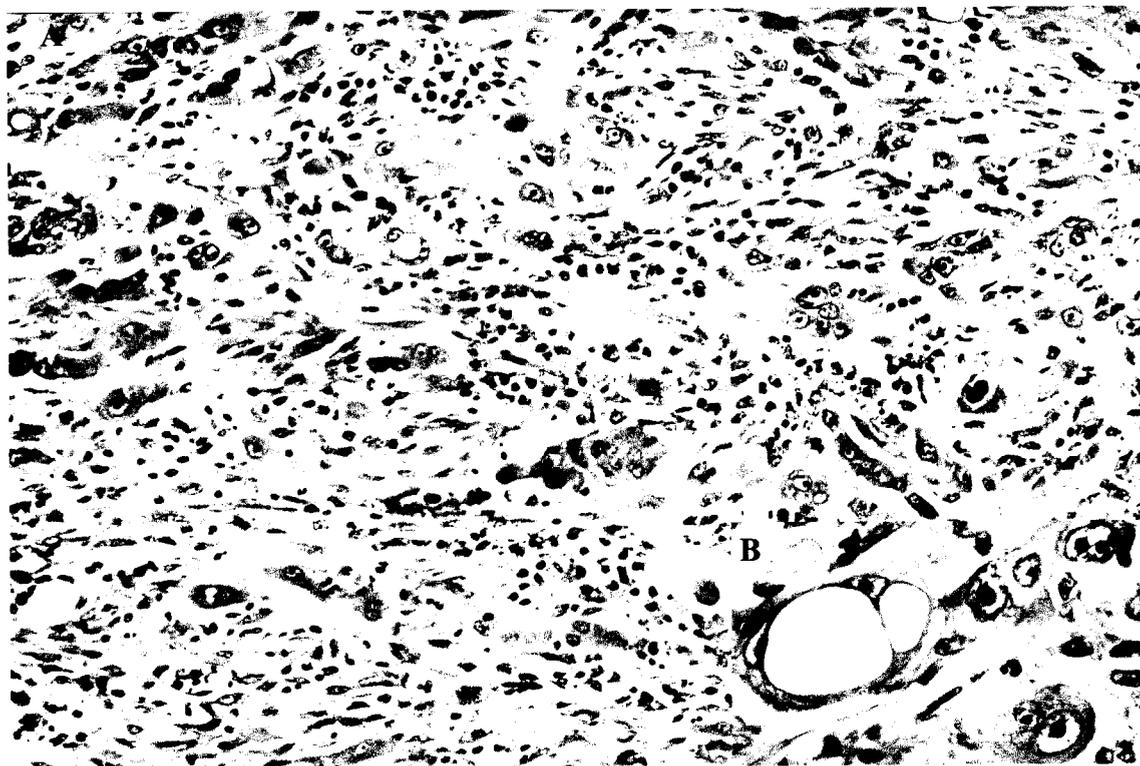


Fig. 30 - Carcinoma indiferenciado: perda da arquitectura e atipia citológica marcada. (H&E, A: 200x, B 600x).

5. LESÕES UROTELIAIS ASSOCIADAS ÀS NEOPLASIAS VESICAIS

A mucosa vesical adjacente às neoplasias uroteliais foi avaliada na totalidade da série das neoplasias em estudo e apresentou com frequência hemorragias, áreas de cistite cística e cistite glandular, por vezes com formação de estruturas vilosas.

As alterações uroteliais de tipo hiperplásico e metaplásico ocorreram associadas às neoplasias independentemente do tipo histológico mas, as lesões de displasia de alto grau associaram-se exclusivamente a neoplasias transicionais. Em virtude das neoplasias de tipo histológico não transicional serem em número reduzido (n=8), bem como as lesões de hiperplasia e metaplasia a estas associadas, todo o estudo estatístico apresentado se refere ao urotélio não neoplásico adjacente a 43 neoplasias transicionais.

As lesões de hiperplasia (n=38) e metaplasia (n=24) encontraram-se associadas a neoplasias transicionais com a frequência relativa de 88,4% e 55,8%, respectivamente. Foram estudadas lesões de hiperplasia simples, nodular (ninhos de von Brunn), papilar ou mista (com presença simultânea de mais de um tipo de hiperplasia), e lesões de metaplasia epidérmica, glandular ou mista (com presença de mais de um tipo metaplásico).

As lesões de hiperplasia observadas foram principalmente de tipo nodular (n=19; 44,2%) seguidas das lesões de tipo misto (n=17; 39,5%). As lesões de metaplasia observadas foram exclusivamente lesões de metaplasia glandular (n=24), por vezes com focos de diferenciação glandular de tipo intestinal.

As lesões de displasia de alto grau, com pleomorfismo marcado, mitoses suprabasais, índice mitótico elevado, perda da polaridade celular e nuclear, ocorreram associadas a 20,9% (n=9) das neoplasias uroteliais.

Estas lesões associaram-se principalmente a neoplasias de alto grau, mas nem sempre a diferença atingiu significado estatístico (Tabela 11).

Tabela 11 - Lesões não neoplásicas adjacentes às neoplasias transicionais.

Lesões uroteliais	Carcinomas transicionais		p
	Baixo Grau n (%)	Alto Grau n (%)	
Hiperplasia			
Ausente	5 (20,8)	0 (0,0)	0,056
Presente	19 (79,2)	19 (100,0)	
Metaplasia			
Ausente	15 (62,5)	4 (21,1)	0,007
Presente	9 (37,5%)	15 (78,9)	
Displasia			
Ausente	21 (87,5)	13 (68,4)	0,150
Presente	3 (12,5%)	6 (31,6)	



Fig. 31 - Hiperplasia nodular com áreas de diferenciação glandular de tipo intestinal (H&E, 200x).

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO

Foram avaliadas apenas as lesões de hiperplasia e o urotélio normal. As lesões hiperplásicas apresentaram índice mitótico superior ao do urotélio normal, com valores similares ao das neoplasias de baixo grau. Relativamente ao índice de Ki-67, a hiperplasia

apresentou valor mediano significativamente superior ao do urotélio normal (Fig. 32; Tabela 12), mas menor que a mediana das neoplasias transicionais (Fig. 33).

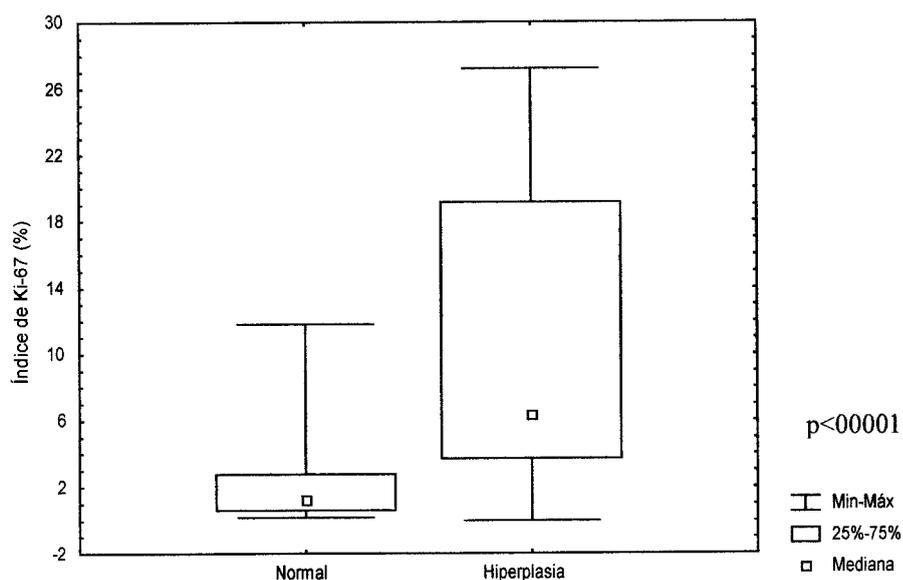


Fig. 32 - Diferenças entre o índice de Ki-67 do urotélio normal e hiperplásico.

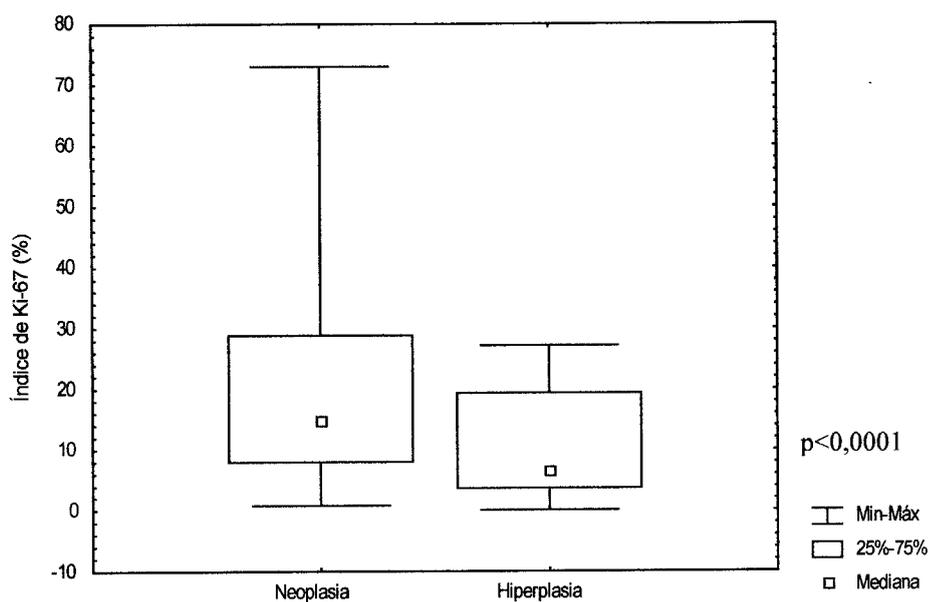


Fig. 33 - Diferenças entre o índice de Ki-67 das lesões hiperplásicas e neoplásicas.

Tabela 12 - Índices de proliferação das lesões de hiperplasia e urotélio normal.

Parâmetros	Hiperplasia (n=38)	Normal (n=42)
Índice mitótico		
Mediana	0,20	0,00
(Min-Máx)	0,00-1,40	0,00-0,40
Antigénio Ki-67		
Mediana	6,10	1,20
(Min-Máx)	0,00-27,20	0,20-11,80

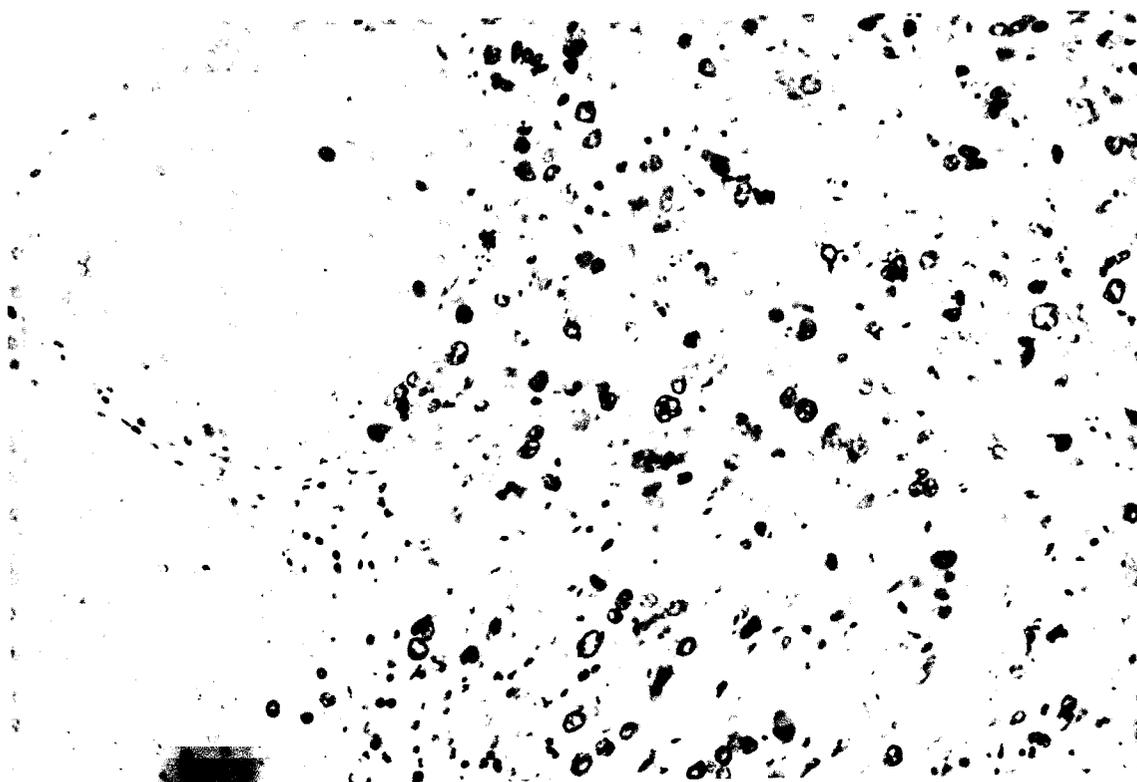


Fig. 34 - Diferença de imunoreactividade ao Antigénio Ki-67 de um carcinoma de alto grau e uma lesão de hiperplasia nodular (200x).

CARACTERÍSTICAS IMUNOCITOQUÍMICAS

Não foi observada imunoreactividade à Vimentina no urotélio não neoplásico. Relativamente à Caderina E a imunomarcagem foi heterogénea e inconstante; das lesões estudadas (n=20), 60% apresentaram positividade citoplasmática e 40% marcação citoplasmática evidenciando a membrana celular.



Fig. 35 - Lesão de displasia de alto grau (H&E, 200x).



Fig. 36 - Urotélio não neoplásico: imunorreactividade citoplasmática e membranar à Caderina E (200x).

ANÁLISE DE CITOMETRIA DE IMAGEM

No presente trabalho o conteúdo de ADN foi avaliado por Citometria de Imagem, tendo-se estudado a totalidade da amostra (n=55) das neoplasias vesicais a que nos reportamos previamente. Destas obtivemos histogramas interpretáveis em 53 dos casos (96,4%). Foram excluídas 2 neoplasias transicionais por impossibilidade de efectuar a sua avaliação citométrica, provavelmente devido à deficiente preservação do material. Lembramos que a fixação induz alterações na cromatina, pelo que esta técnica requer um controlo rigoroso das condições de fixação (Weid *et al.*, 1989), o que não foi possível nesta série de neoplasias.

Como referido, os histogramas de ADN foram classificados em diplóides de ADN e aneuplóides de ADN. Contudo, dentro desta última categoria observou-se que o grupo de neoplasias com conteúdo de ADN multiplóide associou-se a características classicamente conotadas com comportamento biológico mais agressivo. Por esta razão, todo o nosso estudo vai incidir sobre estes 3 grupos neoplásicos: diplóides, aneuplóides e multiplóides de ADN.

NEOPLASIAS TRANSICIONAIS

1.1. VARIÁVEIS AVALIADAS POR CITOMETRIA

1.1.1. PLOIDIA DE ADN

Para a análise estatística da associação entre esta variável e os parâmetros patológicos foi aplicado o teste Qui-Quadrado. No entanto, os resultados do teste foram considerados não válidos, provavelmente devido ao reduzido número de casos em cada uma das três classes de ploidia de ADN. Por esse facto apenas se apresentam as frequências relativas de cada classe. Os resultados desta variável citométrica encontram-se sumariados na Tabela 13 (em Anexos).

Os carcinomas transicionais apresentaram frequentemente conteúdo de ADN anómalo, observando-se aneuploidia de ADN em 28 (62,2%) dos carcinomas e ADN multiplóide em 4 (8,9%). Apenas 13 (28,9%) carcinomas da nossa amostra apresentaram conteúdo de ADN diplóide.

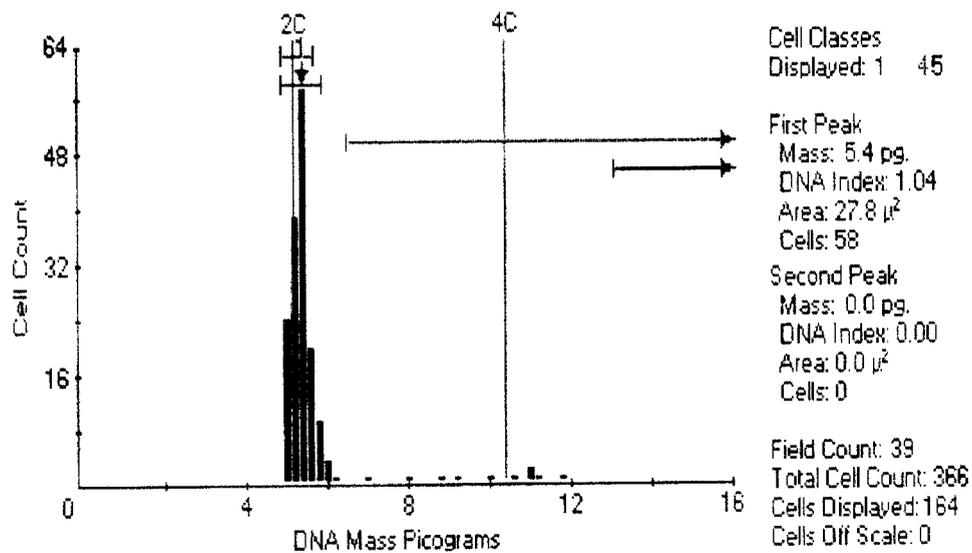


Fig. 37 - Histograma diplóide de ADN.



Fig 38 - Carcinoma de baixo grau com crescimento papilar invertido, que apresentou conteúdo de ADN diplóide (H&E, 100x).

As neoplasias diplóides de ADN pertenciam principalmente ao grupo dos carcinomas de baixo grau. Os valores percentuais de aneuploidia de ADN foram similares nos dois grupos neoplásicos. Todas as neoplasias multiplóides de ADN eram lesões de alto grau (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação entre ploidia de ADN e o grau neoplásico.

Grau neoplásico	Diplóides de ADN	Aneplóides de ADN	Multiplóides de ADN
	n (%)	n (%)	n (%)
Baixo Grau	9 (69,2)	15 (53,6)	0 (0,0)
Alto Grau	4 (30,8)	13 (46,4)	4 (100,0)

As lesões aneplóides de ADN apresentaram frequentemente multiplicidade (n=17, 60,7%) e 20 dos casos (71,4%) apresentaram padrão arquitetural papilar; este padrão morfológico ocorreu também em 12 (92,3%) carcinomas diplóides de ADN. Em 75,0% da série de carcinomas multiplóides de ADN possuíam morfologia nodular ou mista e um dos carcinomas apresentava padrão papilar invertido.

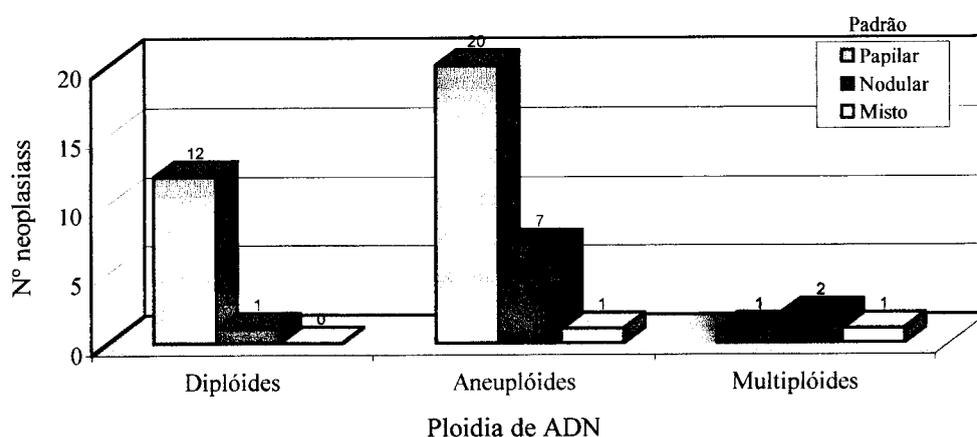


Fig. 39- Associação entre a ploidia de ADN e o padrão arquitetural

A necrose foi mais frequentemente observada em carcinomas aneplóides (57,1%) e multiplóides de ADN (100,0%), detectando-se em apenas 30,8% das lesões diplóides de ADN.

A invasão da parede vesical ocorreu principalmente em carcinomas aneplóides de ADN (64,3%) e multiplóides de ADN, mas em apenas 5 (38,5%) carcinomas diplóides de ADN. A invasão das camadas muscular própria e tecidos perivesicais ocorreu quase exclusivamente em carcinomas aneplóides e multiplóides de ADN.

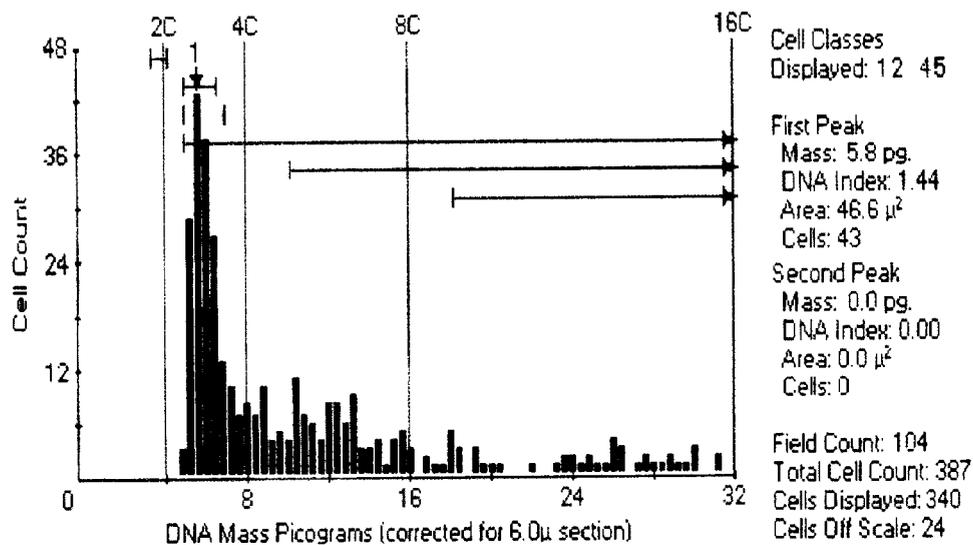


Fig. 40 - Histograma aneuplóide de ADN apresentando células com conteúdo de ADN >9 .

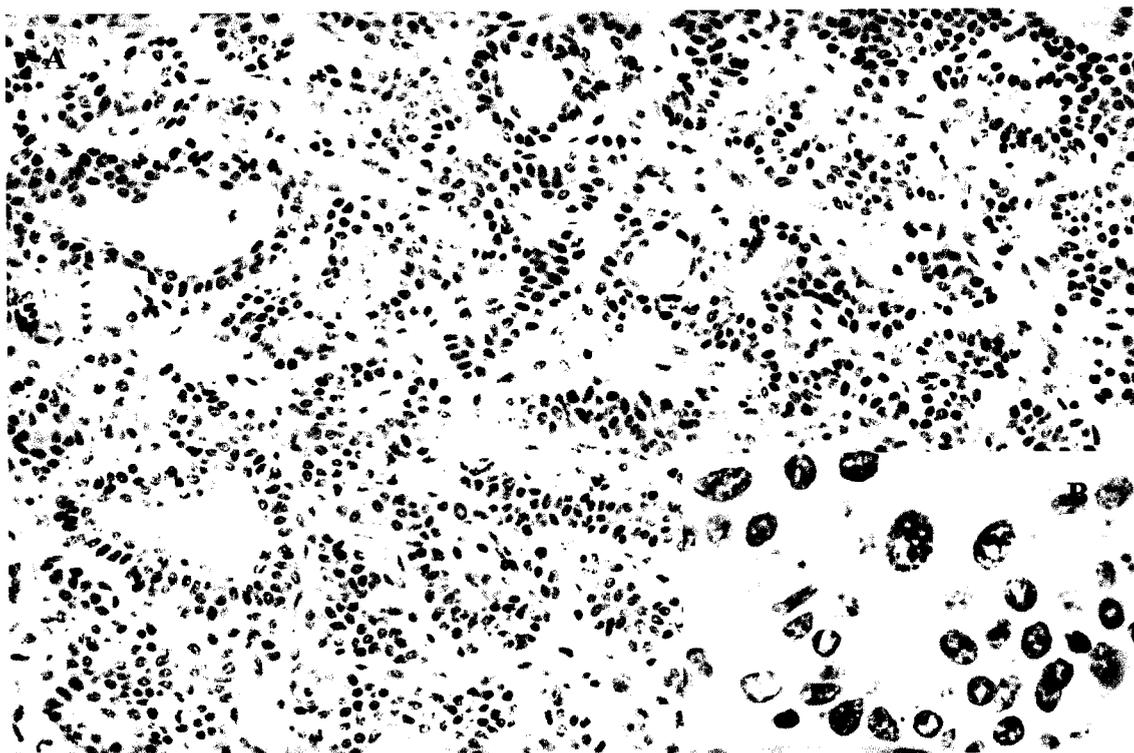


Fig. 41 - Carcinoma papilar invertido de alto grau com conteúdo de ADN aneuplóide, evidenciando heterocromasia e anisocariose (H&E, A: 200x, B: 600x).

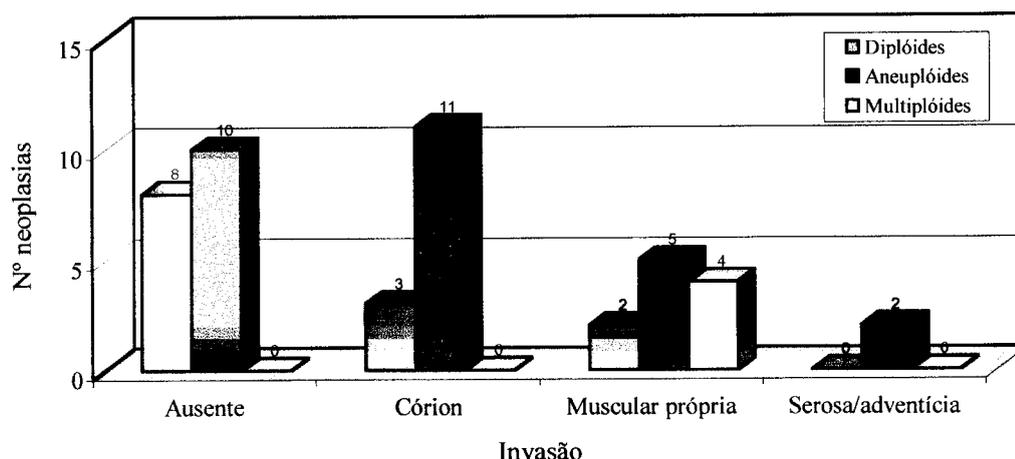


Fig. 42 - Associação entre a ploidia de ADN e o comportamento invasor

3

A permeação vascular ocorreu com frequências idênticas nas neoplasias diplóides (15,4%) e aneuplóides de ADN (17,9%), mas foi mais comum nas neoplasias multiplóides de ADN que apresentaram em 75% dos casos invasão vascular.

A metastização foi um evento raro, tendo ocorrido exclusivamente em carcinomas aneuplóides e multiplóides de ADN.

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO

Ao estudar a associação entre a ploidia de ADN e os parâmetros de proliferação celular, verificámos que os carcinomas diplóides de ADN apresentaram índices mitótico e de Ki-67 menores que as neoplasias aneuplóides de ADN. No grupo de neoplasias aneuplóides de ADN, 50% apresentaram índices de proliferação altos; destacaram-se contudo os carcinomas multiplóides de ADN com índices de proliferação particularmente elevados (Tabela 15)

Tabela 15 - Associação entre ploidia de ADN e os índices de proliferação.

Parâmetros	Ploidia de ADN		
	Diplóide	Aneuplóide	Multiplóide
Mitoses			
Mediana	0,40	0,90	3,20
Mínimo-Máximo	0,20-2,00	0,00-3,80	2,60-12,80

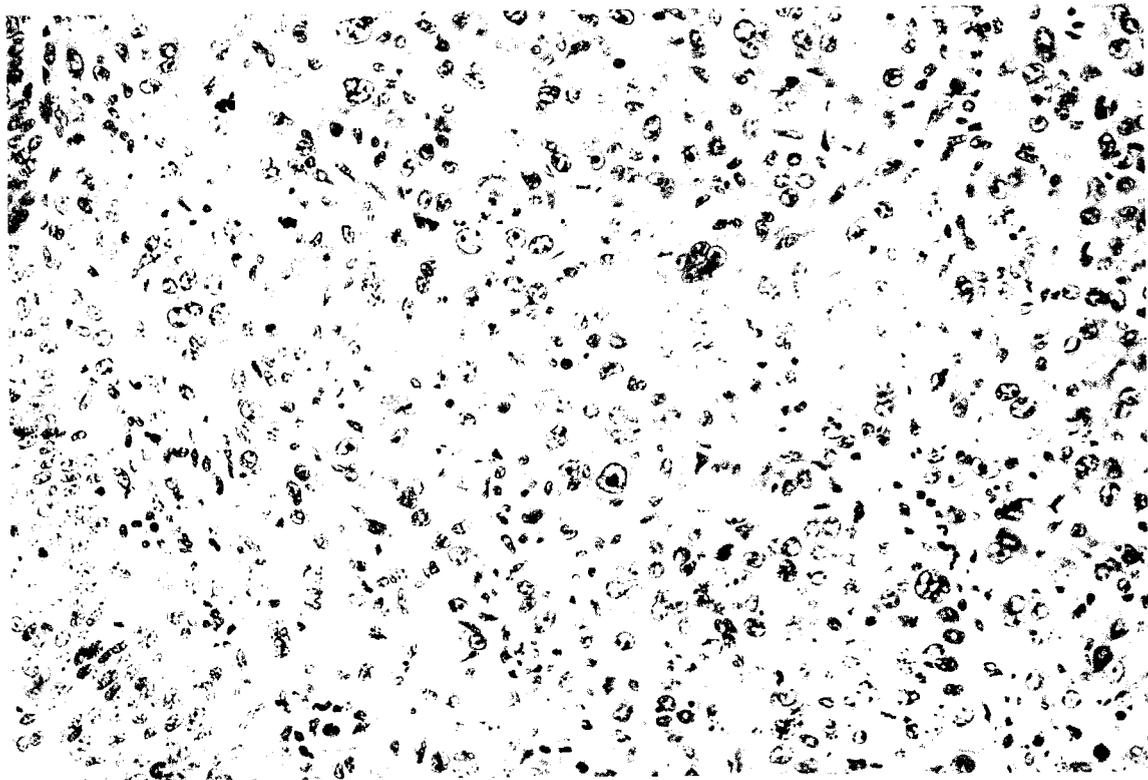


Fig. 43 - Carcinoma anaplásico com conteúdo multiplóide de ADN (H&E, 200x).

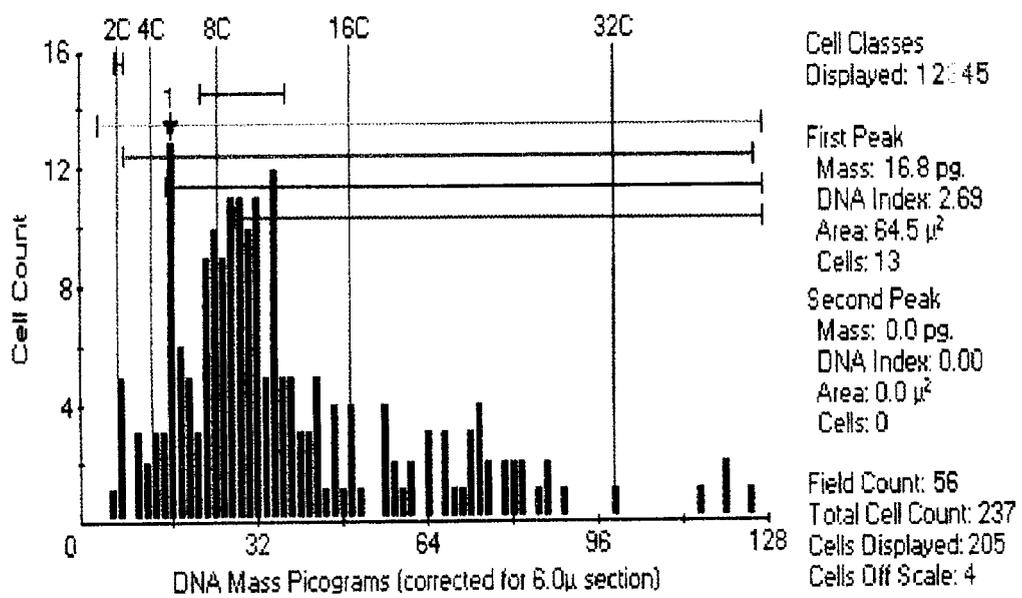


Fig. 44 - Histograma multiplóide de ADN.

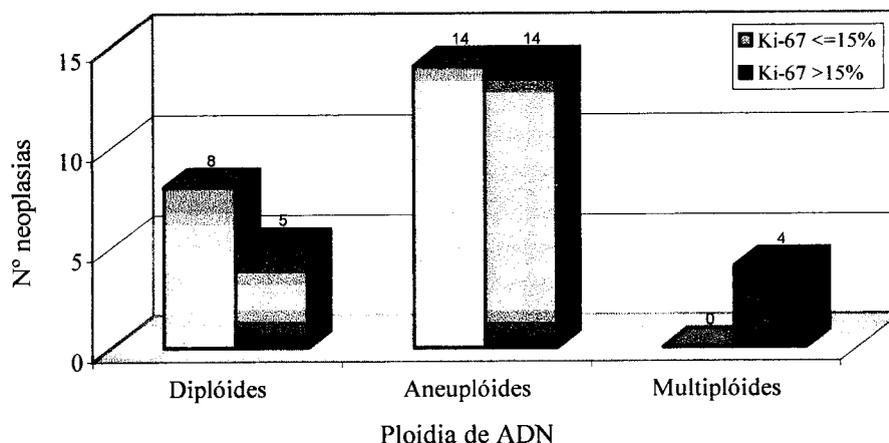


Fig. 45 - Associação entre ploidia de ADN e a imuno-expressão do Antígeno Ki-67.

CARACTERÍSTICAS IMUNOCITOQUÍMICAS

Vimentina

A imunoreactividade a este marcador conjuntivo ocorreu na totalidade dos carcinomas multiplóides de ADN mas só foi observado em 4 (30,8%) dos carcinomas diplóides e em 9 (32,1%) dos aneuplóides de ADN.

Caderina E

A expressão desta proteína de adesão celular verificou-se na maioria das neoplasias diplóides (100%), aneuplóides (81,8%) e multiplóides de ADN analisadas (100%), estando ausente em apenas duas neoplasias de conteúdo de ADN aneuplóide.

CEA

A imunomarcagem ocorreu principalmente em neoplasias multiplóides (n=3; 75,0%) e diplóides (n=7; 53,9%) de ADN mas foi menos frequente nos carcinomas aneuplóides de ADN (n=9; 32,1%). Verificou-se tendência a marcação citoplasmática nas neoplasias multiplóides de ADN, enquanto nos restantes grupos a expressão ocorreu quer no citoplasma quer no revestimento apical do urotélio e áreas glandulares.

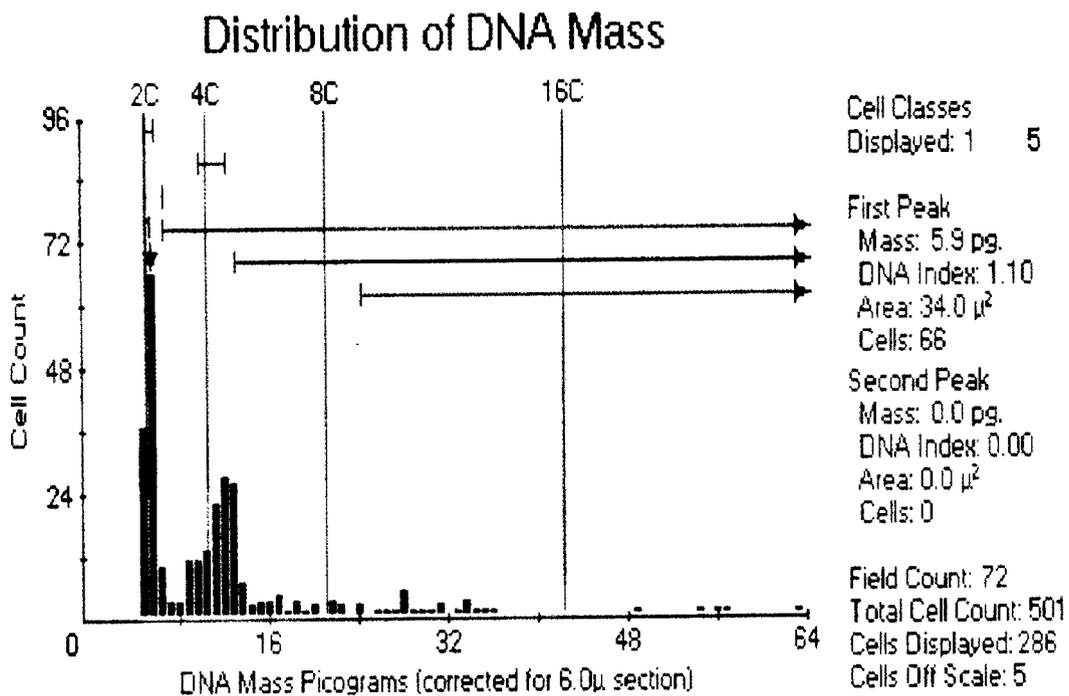


Fig. 46 - Histograma aneuplóide de ADN evidenciando uma população celular diplóide de ADN.

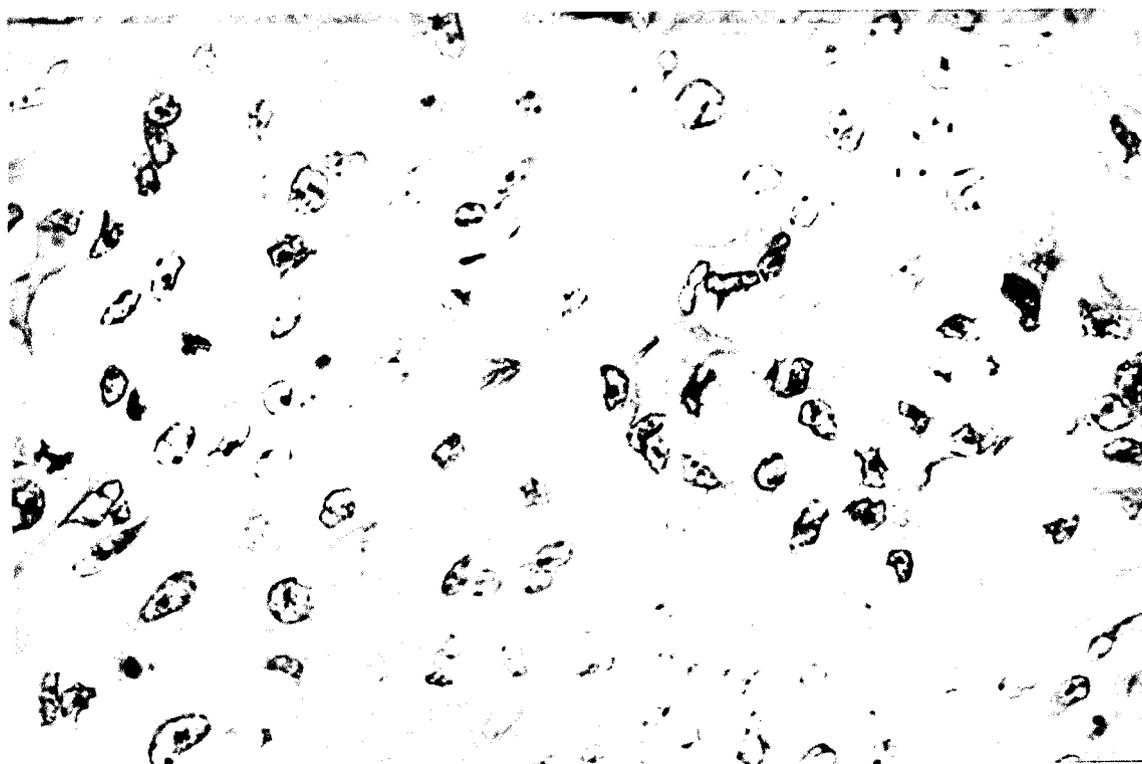


Fig. 47 - Carcinoma de alto grau aneuplóide de ADN (H&E, 400x).

5.1.2. ÍNDICE de ADN (ID)

O valor mediano de ID das neoplasias transicionais foi de 1,2 (mínimo 0,99, máximo 4,79). Para efeitos de comparação com as variáveis patológicas utilizou-se o valor mediano como valor “cut-off” para definir os intervalos de baixo ($\leq 1,2$) e alto ($> 1,2$) ID.

Os carcinomas que apresentaram ID baixo possuíam predominantemente morfologia papilar (91,3%) enquanto os que possuíam ID alto apresentaram com maior frequência padrão morfológico nodular (36,4%) ou misto (9,1%). Relativamente ao grau nuclear, 14 (63,6%) dos carcinomas de ID alto eram de alto grau enquanto os de ID baixo incluíam principalmente carcinomas de baixo grau nuclear (n=16; 69,6%).

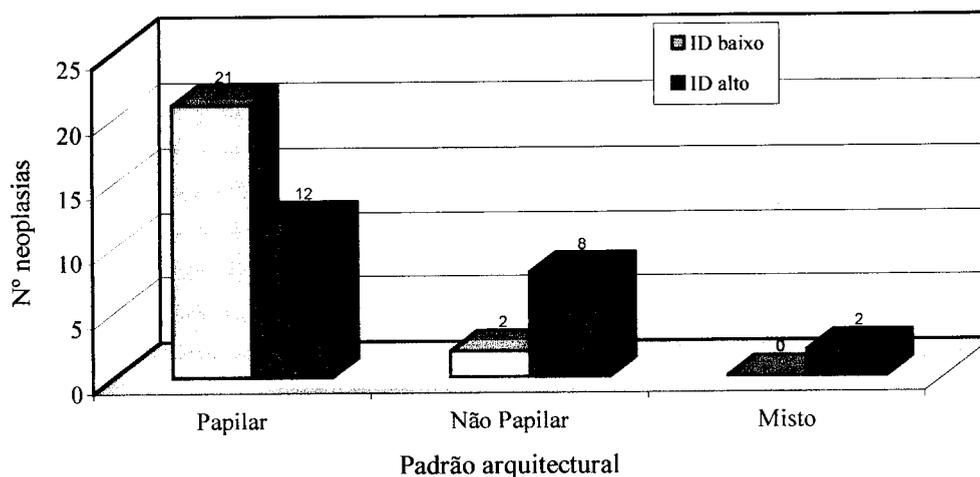


Fig. 48 - Associação entre o Índice de ADN (ID) e o padrão morfológico.

A presença de focos de necrose observou-se principalmente em neoplasias de ID alto (68,2%) mas foi também detectada em 39,1% das neoplasias de ID baixo ($p=0,05$).

Quando analisámos a relação entre o valor de ID e o comportamento invasor, observámos diferenças significativas: 56,5% das neoplasias com ID baixo não invadiram a parede vesical, mas este evento ocorreu em 77,3% das neoplasias de ID alto ($p=0,021$). A invasão da camada muscular própria e serosa ocorreu em 45,5% das neoplasias de ID alto e em apenas 13,0% das de ID baixo.

Observámos ainda diferenças relativamente à permeação vascular. Esta ocorreu em 7 (31,8%) das neoplasias com ID alto e em apenas 3 (13,0%) dos carcinomas com ID baixo, ainda que estes valores não tenham atingido significado estatístico. O mesmo se observou relativamente ao comportamento metastático, apesar de a metastização ter ocorrido exclusivamente em carcinomas de ID alto.

ÍNDICES DE PROLIFERAÇÃO

Relativamente aos parâmetros de proliferação celular encontraram-se diferenças acentuadas. As neoplasias de ID baixo apresentaram valor mediano do índice mitótico significativamente menor que o dos carcinomas de ID alto (Tabela 16), o mesmo se verificando relativamente ao número de células marcadas pelo antigénio Ki-67.

Tabela 16 - Associação entre o Índice de ADN (ID) e o índice mitótico.

Índice mitótico	ID baixo	ID alto	p
Mediana	0,4	2,00	0,002
Mínimo-Máximo	0,00-2,00	0,00-12,80	

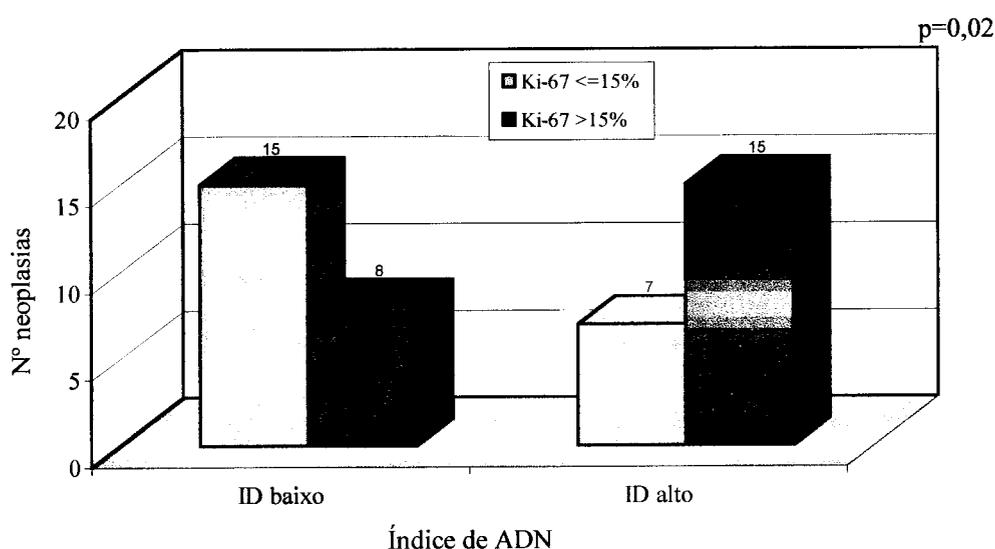


Fig. 49 - Associação entre o Índice de ADN (ID) e a expressão de Antígeno Ki-67.

CARACTERÍSTICAS IMUNOCITOQUÍMICAS

Vimentina

A positividade a este marcador conjuntivo ocorreu preferencialmente nas neoplasias de ID alto (n=12; 54,5%), mas em apenas 21,7% (n=5) das neoplasias de ID baixo (p=0,023).

Caderina E

A percentagem de neoplasias positivas a esta proteína foi idêntica nas neoplasias de ID baixo e alto. A positividade ocorreu principalmente de forma focal ou multifocal, observando-se contudo imunorreactividade difusa em 18,2% das neoplasias de ID baixo; estas diferenças não atingiram significado estatístico.

CEA

A imunorreactividade a este marcador embrionário ocorreu em 50,0% (n=11) da série das neoplasias de ID alto e em 34,8% (n=8) das de ID baixo.

Os resultados obtidos na análise univariada encontram-se sumariadas na Tabela 17 (em Anexos).

5.1.3. CONTEÚDO DE ADN SUPERIOR A 2,5c, 5c E 9c

Cada uma destas variáveis avaliadas por citometria foram categorizadas em dois subgrupos, utilizando como “cut-off” a respectiva mediana (Tabela 18).

Tabela 18 - Intervalos de variação das variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c.

Parâmetros	Mínimo	Máximo	Mediana	Intervalo de variação	
				Baixo	Alto
>2,5 c	3,92	100,00	43,94	≤43,94	>43,94
>5c	0,00	81,34	3,75	≤3,75	>3,75
>9c	0,00	36,41	0,00	0,00	>0,00

Os carcinomas de baixo grau apresentaram fracções de células com conteúdo de ADN >2,5c e >5c baixas, enquanto nos carcinomas de alto grau estes parâmetros citométricos apresentaram valores significativamente superiores. Os carcinomas de alto grau apresentaram

com maior frequência núcleos verdadeiramente aneuplóides, com teor de ADN $>5c$ (76,2%) e $>9c$ (76,2%). Estas diferenças apresentaram significado estatístico (Tabela 19).

Tabela 19 - Associação das variáveis citométricas $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$ e o grau neoplásico.

Carcinomas	$>2,5c$		p	$>5c$		p	$>9c$		p
	Baixo n(%)	Alto n(%)		Baixo n(%)	Alto n(%)		Baixo n(%)	Alto n(%)	
Baixo Grau	17 (77,3)	7 (29,2)	0,002	18 (78,3)	6 (27,9)	$p<0,002$	18 (78,3)	6 (27,9)	$p<0,002$
Alto Grau	5 (22,7)	16 (69,6)		5 (21,7)	16 (69,6)		5 (21,7)	16 (69,6)	

A multifocalidade não apresentou associação estatística com estes parâmetros citométricos, mas estes associaram-se de forma significativa com a padrão de crescimento. Os carcinomas de crescimento não papilar e misto apresentaram percentagens mais elevadas de células de teor aberrante de ADN $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$, que as neoplasias papilares.

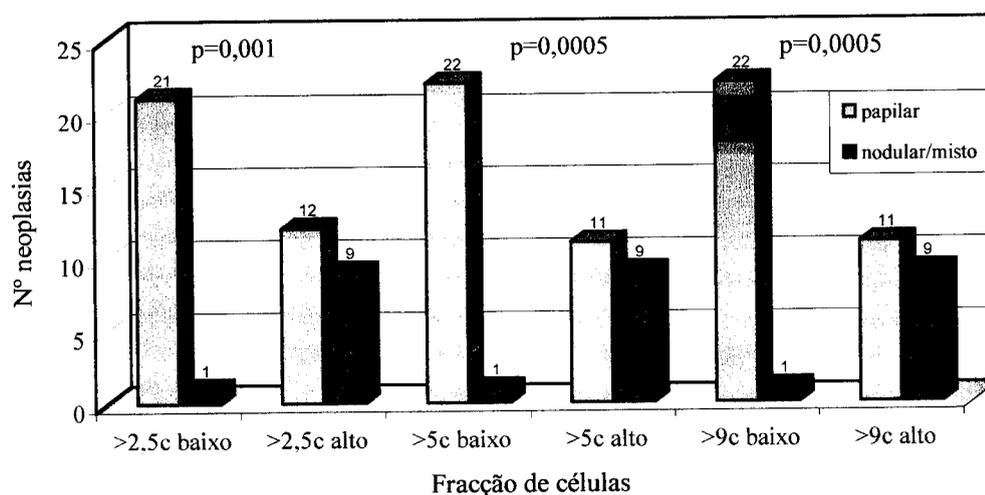


Fig. 50 - Associação entre a fração de células com conteúdo anômalo de ADN ($>2,5c$, $>5c$ e $>9c$) e o padrão arquitetural.

Quando avaliámos a ocorrência de necrose verificámos que as neoplasias com fração elevada de células com conteúdo de ADN superior a $2,5c$, $5c$ e $9c$ apresentaram frequentemente focos de necrose, o que foi significativamente menos comum nas neoplasias com estes parâmetros citométricos baixos.

Foram também observadas diferenças relativamente ao comportamento invasor. As neoplasias que possuíam elevado número de células com ADN anómalo (>2,5c, >5c e >9c), apresentaram frequentemente comportamento invasor e corresponderam a neoplasias que invadiam profundamente a parede vesical. Os carcinomas que possuíam estes parâmetros citométricos baixos invadiram com menor frequência; neste grupo incluíram-se 7 carcinomas que infiltraram o córion (2 diplóides e 5 aneuplóides de ADN) e 1 carcinoma diplóide com invasão da camada muscular própria.

Do total da série em estudo (n=45), 39 carcinomas (28 aneuplóides e 11 diplóides de ADN) possuíam células >5c, dos quais 27 (69,2%) apresentaram comportamento invasor.

Dos carcinomas que apresentavam células >9c (n=22), 7 possuíam ID baixo e 15 ID alto. Dos carcinomas de ID baixo, 5 possuíam comportamento invasor e apenas 2 eram diplóides de ADN. Os carcinomas de ID alto eram todos invasores excepto um, possuíam conteúdo de ADN aneuplóide (n=12) ou multiplóide (n=2) e 10 apresentavam invasão da camada muscular própria.

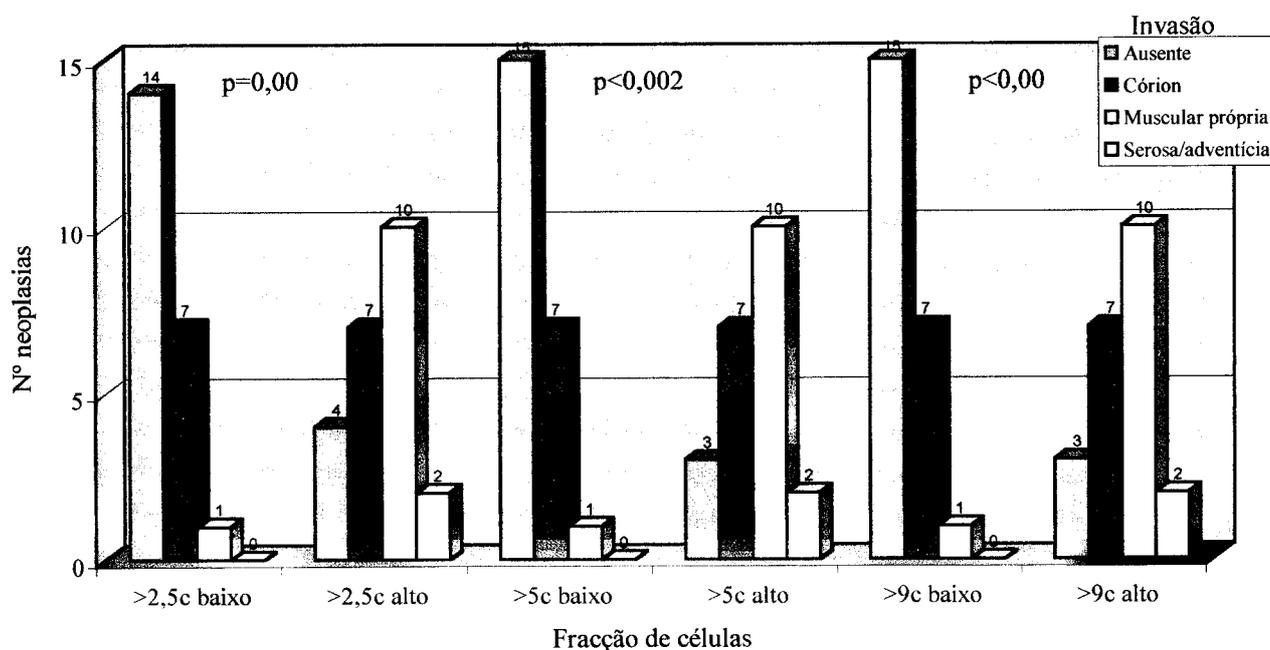


Fig. 51 - Associação entre a fracção de células com teor anómalo de ADN (>2,5c, >5c, >9c) e a invasão da parede vesical

A permeação vascular ocorreu em neoplasias que apresentaram estes parâmetros citométricos elevados, tendo ocorrido em apenas 2 neoplasias com valores baixos para estas variáveis; devido à baixa amostragem não ocorreram diferenças significativas em termos estatísticos. O mesmo se verificou relativamente ao comportamento metastático, apesar deste ter ocorrido exclusivamente em neoplasias com número elevado de células com ADN $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$.

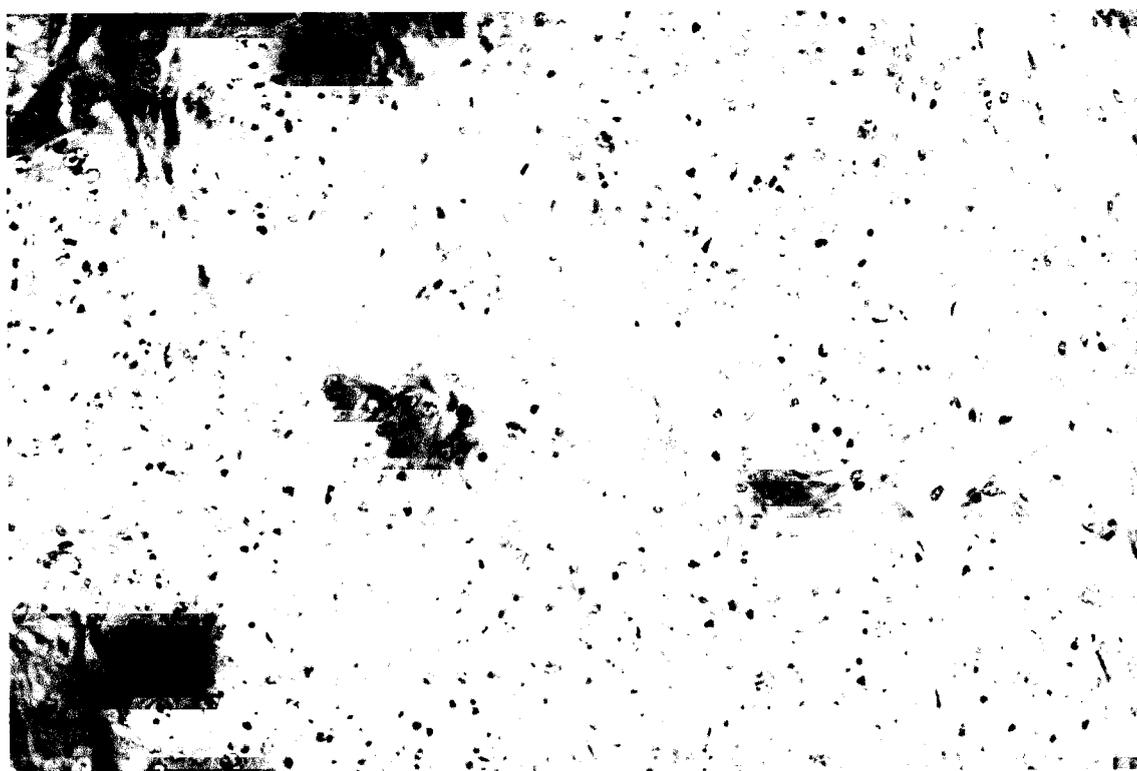


Fig. 52 - Metástase hepática de carcinoma de alto grau (H&E, 200x).

PROLIFERAÇÃO CELULAR

Quando analisámos estas variáveis citométricas e os índices de proliferação celular, verificámos que as neoplasias com índices mitótico e de Ki-67 baixos, apresentaram valores significativamente mais baixos destes parâmetros citométricos e os carcinomas que possuíam índices de proliferação altos apresentaram frequentemente células com ADN anómalo ($>2,5c$, $>5c$ e $>9c$) (Tabela 20).

Tabela 20 - Associação entre a fracção de células com conteúdo de ADN anómalo (>2,5c, >5c, >9c) e a imunorreactividade ao Antígeno Ki-67.

Ki-67	>2,5c		p	>5c		p	>9c		p
	Baixo n(%)	Alto n(%)		Baixo n(%)	Alto n(%)		Baixo n(%)	Alto n(%)	
Baixo (≤15%)	15 (68,2)	7 (30,4)	0,011	16 (69,5)	6 (27,3)	0,0045	16 (69,5)	6 (27,3)	0,0045
Alto (>15%)	7 (31,8)	16 (69,6)		7 (30,4)	16 (72,7)		7 (30,4)	16 (72,7)	

CARACTERÍSTICAS IMUNOCITOQUÍMICAS

Vimentina

A imunorreactividade a este marcador ocorreu principalmente em neoplasias com alta fracção de células com conteúdo de ADN >2,5c, >5c e >9c. Das 17 neoplasias positivas apenas 3 possuíam baixa percentagem de células com ADN >5c e >9c. Estas diferenças apresentaram elevado significado estatístico (p=0,008; p=0,0005 e p=0,0005 para as variáveis >2,5c, >5c e >9c, respectivamente).

Caderina E

Relativamente à imuno-expressão desta glicoproteína verificou-se positividade quer em neoplasias com fracção baixa de ADN >2,5c, >5c e >9c, quer nas que apresentaram estes parâmetros altos. Apenas duas neoplasias com valores de ADN >2,5c, >5c e >9c altos não expressaram esta molécula de adesão.

CEA

Apesar de não terem ocorrido diferenças significativas entre as neoplasias com valores baixos e altos de ADN >2,5c, >5c e >9c, constatámos que as neoplasias com estes parâmetros mais elevados apresentaram menor imunorreactividade ao CEA. Nas neoplasias com estes parâmetros citométricos altos, a marcação ocorreu preferencialmente a nível citoplasmático, enquanto as neoplasias com parâmetros baixos apresentaram predominantemente positividade citoplasmática e no revestimento apical do urotélio ou das áreas glandulares.

Os resultados obtidos na análise estatística desta variável encontram-se sumariados na Tabela 21 (em Anexos).

5.2. CARCINOMAS BIFÁSICOS

As neoplasias deste tipo apresentaram conteúdo de ADN anómalo. Quatro carcinomas apresentaram conteúdo de ADN aneuplóide, quer no componente transicional quer no adenocarcinoma, contudo não se observaram núcleos com conteúdo de ADN muito aberrante ($>5c$, $>9c$). A neoplasia que no exame histológico revelou menor diferenciação nos dois componentes celulares, transicional e glandular, apresentou múltiplos clones aneuplóides no componente transicional e aneuploidia no componente adenocarcinoma. Esta neoplasia, mais anaplasica, possuía elevadas percentagens de células $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$ quer no componente transicional (62,33%, 19,86% e 2,74%, respectivamente), quer no componente adenocarcinoma (56,86%, 12,9% e 1,61, respectivamente). É ainda de realçar que todas as neoplasias que invadiram a parede vesical apresentaram células uroteliais e glândulares com conteúdo de ADN nuclear superior a $5c$.

5.3. ADENOCARCINOMAS

As duas neoplasias deste tipo apresentaram conteúdo diplóide de ADN. Apesar de possuir conteúdo normal de ADN, uma das neoplasias apresentava 25,35% de células com conteúdo de ADN $>2,5c$ e núcleos verdadeiramente aneuplóides, $>5c$ (0,47%); esta neoplasia apresentou também um elevado índice mitótico (2,8%) e de Ki-67 (37,0%).

5.4. CARCINOMA INDIFERENCIADO

Esta neoplasia apresentava conteúdo de ADN aneuplóide e possuía elevado número de células $>2,5c$ (81,38), $>5c$ (42,76%) e $>9c$ (10,34%).

5.5. UROTÉLIO NÃO NEOPLÁSICO

Lesões de hiperplasia

Foram analisadas por citometria de imagem 20 lesões de hiperplasia adjacentes a carcinomas vesicais. Apenas 25% destas lesões se associaram a carcinomas diplóides de ADN, encontrando-se as restantes na periferia de carcinomas aneuplóides e multiplóides. Das lesões hiperplásicas avaliadas, 16 (80,0%) possuíam conteúdo de ADN aneuplóide e apenas 4 (20,0%) eram diplóides de ADN. Algumas lesões apresentaram células com ADN superior a

2,5c, 5c e 9c. Os valores medianos destes parâmetros foram usados como valor cut-off para subdividir as lesões em dois grupos, com valores alto e baixo para estas variáveis (Tabela 22).

Tabela 22 - Valores das variáveis citométricas > 2,5c, >5c e >9c.

Variáveis	Mediana	Mínimo	Máximo	Índices citométricos	
				Baixo n(%)	Alto n(%)
>2,5c	25,73	2,82	100	9(45,0)	11(55,0)
>5c	0,94	0,0	16,94	10(50,0)	10(50,0)
>9c	0,0	0,0	2,04	16(80,0)	4(20,0)

Relativamente às lesões hiperplásicas adjacentes às neoplasias transicionais, observámos que estas ocorriam com frequência idêntica em associação com neoplasias de ID alto e baixo, bem como com variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c baixas e altas. Quando comparámos estes parâmetros citométricos (>2,5c, >5c e >9c) dos dois tipos de lesões obtivemos valores significativamente diferentes (Tabela 23).

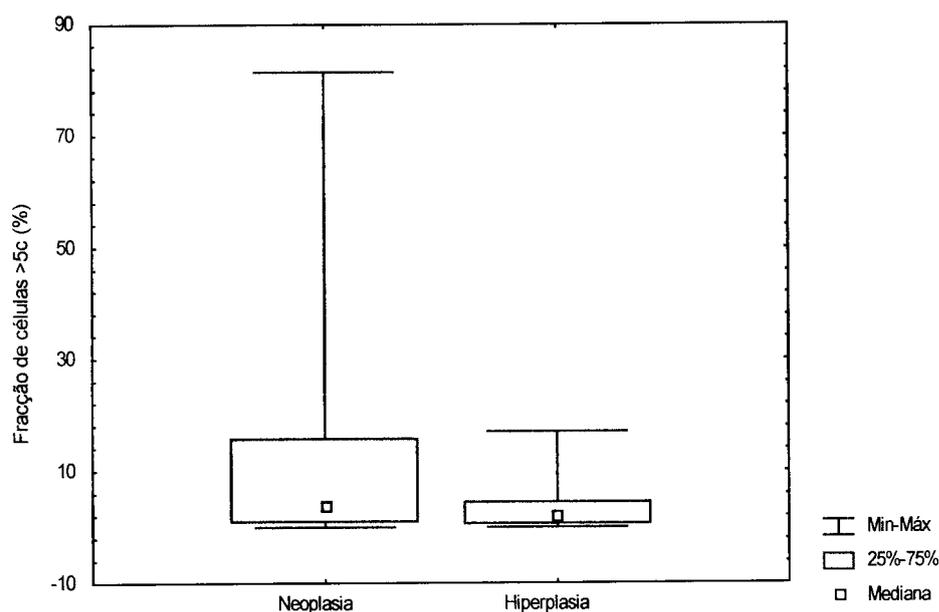


Fig. 53 - Fração de células verdadeiramente aneuplóides (>5c) das lesões de hiperplasia e neoplasia.

Tabela 23 - Diferenças entre os índices citométricos das lesões de hiperplasia e neoplasia.

Variáveis	Hiperplasia	Neoplasia	p
>2,5c			
Mediana	25,89	43,94	0,005
(Min-Max)	(7,14-100,0)	(3,92-100,0)	
>5c			
Mediana	1,83	3,78	0,005
(Min-Max)	(0,0-16,94)	(0,0-81,34)	
>9c			
Mediana	0,0	0,0	0,001
(Min-Max)	(0,0-2,04)	(0,0-36,41)	

Lesões de metaplasia e displasia.

Estas lesões encontraram-se frequentemente na periferia de carcinomas transicionais aneuplóides de ADN, com ID elevado e fracção alta de células com ADN >2,5c; >5c; >9c.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Este estudo em carcinomas do urotélio foi realizado em material vesical colhido no Matadouro Industrial de Ponta Delgada. Era proveniente de bovinos de aptidão leiteira, predominantemente de raça Frísia no final da sua vida produtiva (idade média de 6 anos), que apresentavam sintomatologia clínica de Hematúria Enzóótica; os bovinos foram abatidos ao abrigo da Portaria 7/95 da Secretaria Regional de Agricultura e Pescas da Região Autónoma dos Açores, que previa o abate compulsivo de bovinos portadores de carcinomas e indemnização aos proprietários. Apesar da alta prevalência das neoplasias neste grupo de animais não existe predisposição sexual ou racial (Cardellino, 1993). São os interesses económicos e finalidade zotécnica que justificam o aparecimento das neoplasias neste grupo de animais, pois os bovinos leiteiros têm uma vida média produtiva superior aos de aptidão cárnea. A Hematúria Enzóótica Crónica é um síndrome de bovinos adultos (Özkul e Aydin, 1996; Jean-Blain, 1998) que pode afectar todas as raças bovinas de idade entre os 4 e os 12 anos, sendo a doença rara em animais jovens (Cardellino, 1993).

O nosso estudo deparou com várias limitações nomeadamente, material deficientemente preservado, por vezes em quantidades reduzidas e ausência de estudos sobre a biopatologia das neoplasias animais que pudessem ser utilizados como referência.

Para a realização deste trabalho, todas as neoplasias vesicais recebidas no Laboratório de Histologia e Anatomia Patológica da UTAD entre 1994 e 1996 foram reavaliadas e seleccionadas de acordo com o descrito em Material e Métodos. A maioria das neoplasias eram de natureza epitelial e malignas, o que confirma o descrito na literatura de Medicina Veterinária que refere frequências relativas de neoplasias uroteliais primárias em bovinos entre 80 e 90% (Pamukcu, 1974; Cardellino, 1993). Avaliámos 55 neoplasias uroteliais que em 56,4% dos casos coexistiam com outras neoplasias epiteliais ou mesenquimatosas, o que já foi observado em outros estudos sobre Hematúria Enzóótica (Özkul e Aydin, 1996). A multiplicidade reflecte a existência de um urotélio instável por exposição de toda a mucosa vesical a agentes carcinogénicos e factores de crescimento presentes na urina (conceito de campo) (Rao *et al.*, 1993; Witjes *et al.*, 1993; Chern *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996).

As frequências relativas dos diferentes tipos histológicos é similar à observada em Medicina Humana, sendo as neoplasias mais comuns as de tipo transicional (85,5%) e

raros os adenocarcinomas (3,6%) e os carcinomas indiferenciados (1,8%) (Pamukcu, 1974; Murphy, 1992; Bane *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Murphy, 1997; Cotran *et al.*, 1999).

Nesta série de neoplasias não observámos nenhuma neoplasia transicional com características benignas.

Os carcinomas uroteliais revelaram uma grande capacidade de diferenciação divergente e frequentemente foram observados padrões de crescimento variáveis entre os vários carcinomas e também dentro da mesma neoplasia. Áreas de diferenciação glandular foram observadas com uma frequência relativa e exuberância muito superior ao referido na literatura consultada, enquanto que a diferenciação epidermóide, comum no homem (Griffiths, 1992; Grignon, 1997; Murphy, 1997) apenas foi detectada num carcinoma. Quanto às características histológicas foram observadas formas puras de carcinomas transicionais e carcinomas com áreas de diferenciação glandular; sempre que as áreas glandulares foram superiores a 10% da massa neoplásica total, os carcinomas foram designados de mistos ou bifásicos. Este tipo neoplásico caracteriza-se pela coexistência de extensas áreas de 2 ou mais tipos histológicos diferentes, sendo reconhecido por alguns patologistas de Medicina Humana como uma entidade com características morfológicas e biológicas distintas (Murphy, 1997). Esta classificação não é consensual (Ordóñez e Rosai, 1996) e não é considerada em Medicina Veterinária.

Com base nestes critérios obtivemos 47 carcinomas transicionais e 5 carcinomas de padrão bifásico.

Os carcinomas transicionais foram classificados em carcinomas de Baixo e Alto Grau Nuclear. Com esta classificação pretendíamos agrupar as neoplasias em duas classes com características fenotípicas e biológicas distintas, evitando obter um grupo heterogéneo como o de carcinomas Grau II da classificação da OMS para neoplasias vesicais.

Convencionou-se classificar os carcinomas em Baixo Grau quando apresentavam núcleos monomórficos, pequenos, redondos ou ovóides, com contornos regulares, relação núcleo:citoplasma mantida (ou ligeiramente aumentada), com cromatina homogénea, sem nucléolo proeminente, que se distribuíam uniformemente no urotélio, sem sobreposições e mantendo a polaridade. Os núcleos não apresentavam variações nas afinidades tintoriais. As mitoses eram raras, sem atipias e localizadas geralmente nas camadas basal ou média.

Os carcinomas foram classificados de Alto Grau quando apresentavam núcleos com anisocariose marcada, irregulares por vezes bizarros, com relação núcleo:citoplasma aumentada, heterocromasia acentuada, padrão de cromatina grumosa distribuída de forma

irregular e nucléolo proeminente, com variação de número e forma. Os núcleos podiam observar-se em aglomerados, com alteração de polaridade e as mitoses eram comuns com inúmeras formas anómalas, não se restringindo à camadas basal.

Os carcinomas de baixo grau constituíram 55,3% dos carcinomas transicionais, apresentaram morfologia papilar (padrão clássico (n=17) ou papilar invertido (n=9)). As papilas apresentavam-se espessadas mas as células, similares às do urotélio não neoplásico, possuíam atipia citológica mínima a moderada, distribuíam-se de forma homogênea pelo epitélio e mantinham a polaridade celular; as mitoses eram raras, mas nitidamente mais comuns nos carcinomas de padrão papilar invertido, o mesmo se verificando relativamente à atipia celular e nuclear. A maioria dos carcinomas não apresentava comportamento invasor, ocorrendo invasão do córion em apenas 7 neoplasias, 6 das quais apresentavam padrão papilar invertido. A necrose foi um evento raro.

Os carcinomas de alto grau constituíram 44,7% da série de carcinomas transicionais. Apresentaram predominantemente morfologia nodular ou padrão misto, mas 9 casos possuíam padrão arquitetural papilar (2 padrão clássico e 7 padrão invertido). As células evidenciavam pleomorfismo celular e nuclear acentuado, perda da polaridade (celular e nuclear) perdendo por vezes as características do urotélio normal; as mitoses eram comuns e a necrose usual. A maioria das neoplasias invadia a parede vesical desencadeando alterações desmoplásicas e mixóides do estroma e em 62,0% das neoplasias observou-se invasão da camada muscular própria. Gostaríamos de realçar que 6 dos 7 carcinomas papilares invertidos possuíam comportamento invasor.

Os carcinomas de padrão bifásico constituíram 9,1% da totalidade da série de neoplasias em estudo, valor superior ao referido na literatura de Medicina Humana (Murphy, 1997). Todos os carcinomas deste tipo apresentaram padrão arquitetural papilar, 4 padrão clássico e 1 padrão invertido. O componente transicional apresentou alterações citológicas ou arquiteturais escassas e o índice mitótico foi similar ao dos carcinomas transicionais puros. Apenas um carcinoma apresentou atipia citológica marcada e grau nuclear elevado, apresentando áreas de crescimento sólido e invertido, mitoses frequentes e invasão do córion. A neoplasia de padrão papilar invertido apresentou também comportamento invasor.

O componente adenocarcinoma, caracterizou-se pela formação de estruturas glandulares revestidas por epitélio simples, cúbico ou colunar, com atipia escassa por vezes

com diferenciação glandular de tipo cólon e mitoses raras. Em dois carcinomas observaram-se áreas glandulares com maior atipia nuclear e distorção da arquitectura.

As características citológicas, arquitecturais e o comportamento invasor da série de carcinomas transicionais puros estão de acordo com o referido na literatura de medicina humana analisada (Jordan *et al.*, 1987; Carbin *et al.*, 1991; Griffiths, 1992; Murphy, 1992; Amin *et al.*, 1996; Cordon-Cardo *et al.*, 1997; Murphy, 1997; Epstein *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999). Observámos contudo maior frequência de carcinomas de baixo grau enquanto em medicina humana são mais comuns os carcinomas de alto grau (Murphy, 1997). Os carcinomas uroteliais apresentaram focos de diferenciação glandular com uma frequência e exuberância muito superiores aos referidos na literatura, ocorrendo diferenciação glandular principalmente em carcinomas de baixo grau contrariamente ao referido no Homem (Grignon, 1997). Em Medicina humana o significado clínico da diferenciação glandular e da produção de mucinas é desconhecido (Grignon, 1997) mas alguns estudos associaram este evento a menor resposta à quimioterapia (Ayala e Ro, 1989; Grignon, 1997).

Detectámos também uma frequência relativa de carcinomas de padrão morfológico papilar invertido superior ao descrito nos humanos, que possuíam características fenotípicas associadas a comportamento biológico mais agressivo, mesmo quando pertenciam ao grupo de carcinomas de baixo grau; apresentaram atipia celular moderada a alta, índice mitótico mais elevado. O carcinoma bifásico com este padrão arquitectural também invadiu a parede vesical.

Uma alta actividade mitótica pode ser uma evidência morfológica de rápida proliferação e malignidade nas neoplasias, nomeadamente nas vesicais (Lipponen *et al.*, 1991; Limas, 1993). No nosso estudo, as neoplasias papilares de baixo grau apresentaram um índice mitótico baixo, por vezes menor que o do urotélio não neoplásico, enquanto as neoplasias papilares e nodulares de alto grau apresentaram índice mitótico elevado ($p < 0,0001$). Estas diferenças de índice mitótico foram também observadas em outros estudos (Lipponen *et al.*, 1991). A necrose associou-se também a carcinomas com menor diferenciação e infiltrativos, o que está de acordo com o referido por outros investigadores (Murphy, 1997).

A elevada fracção de carcinomas em estadio avançado que observámos deve-se provavelmente à detecção tardia da neoplasia pelos proprietários, facilitado pelo regime de

criação extensiva e por outro lado, porque os interesses económicos subjacente à exploração pecuária frequentemente superam as medidas de bem estar animal.

Relativamente aos carcinomas bifásicos apenas observámos coexistência de áreas transicionais com áreas de tipo adenocarcinoma enquanto em Medicina humana é mais usual a coexistência de áreas transicionais e epidermóides (Murphy, 1997). A literatura consultada refere que os carcinomas bifásicos tendem a possuir maior agressividade biológica (Ayala e Ro, 1989; Bane *et al.*, 1996; Grignon, 1997), mas os observados nesta série apresentavam, salvo uma excepção, atipia citológica e arquitectural escassa a moderada, apesar de 2 neoplasias serem invasoras.

Neste estudo a frequência relativa de **adenocarcinomas** foi de 3,6%, valor superior ao referido na literatura de Medicina Humana (Ordóñez e Rosai, 1996; Murphy, 1997; Cotran *et al.*, 1999), mas baixo tendo em conta que nos bovinos os adenocarcinomas podem corresponder a 10% da totalidade dos carcinomas primários vesicais (Pamucku, 1974). As duas neoplasias observadas apresentaram crescimento endofítico e invadiam superficialmente o córion mas, eram distintas em termos morfológicos e proliferação celular. Ambos possuíam células mucossecretoras mas uma apresentava atipia celular escassa e índices proliferativos baixos, enquanto que a outra neoplasia apresentava atipia celular marcada, diferenciação glandular de tipo cólico, índice mitótico elevado e necrose. Apesar de em medicina humana se encontrarem usualmente associados a crescimento infiltrativo e mau prognóstico (Griffiths, 1992; Ordóñez e Rosai, 1996) apenas uma neoplasia possuía características patológicas conotadas com comportamento biológico agressivo.

Os **carcinomas indiferenciados** são neoplasias raras (Bane *et al.*, 1996; Ordóñez e Rosai, 1996; Cotran *et al.*, 1999) e constituíram 1,8% dos carcinomas vesicais em estudo. O carcinoma observado possuía atipia citológica acentuada, alteração arquitectural marcada, fracção de crescimento alta e infiltrava profundamente a parede da bexiga até à serosa, observando-se imagens de permeação vascular. O estadio avançado desta neoplasia é frequentemente observado em medicina humana, que conota este tipo neoplásico a mau prognóstico (Griffiths, 1992).

Até à data os factores mais usados para avaliar o comportamento biológico dos carcinomas vesicais são o estadio e o grau, baseados em parâmetros histopatológicos

(Blomjous *et al.*, 1990; Mellon *et al.*, 1990; Carbin *et al.*, 1991; Lipponen *et al.*, 1991; Bringuier *et al.*, 1993; Stavropoulos *et al.*, 1993; Goulandrakis *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1997). Contudo, o comportamento das neoplasias vesicais é imprevisível quando baseado exclusivamente nestas características convencionais (De Vita *et al.*, 1991; Scharpers *et al.*, 1993; Stavropoulos *et al.*, 1993; Bane *et al.*, 1996; Tsuji *et al.*, 1997). Nos últimos anos têm sido desenvolvidos novas técnicas analíticas de diagnóstico, como o padrão citogenético, a ploidia de ADN, as características imunocitoquímicas e a ultra-estrutura (Pauwels *et al.*, 1988; Weid *et al.*, 1989; Blomjous *et al.*, 1990; Stavropoulos *et al.*, 1993; Bane *et al.*, 1996).

Os estudos da cinética celular são úteis para a compreensão da biopatologia tumoral, podendo reflectir a actividade biológica e agressividade clínica (Mellon *et al.*, 1990; Okamura *et al.*, 1990; Lipponen *et al.*, 1991). A proliferação celular é um processo biológico rigorosamente controlado por mecanismos que coordenam o crescimento embrionário e dos tecidos adultos; alterações da sua regulação podem estar na génese das neoplasias (Stein *et al.*, 1998). A taxa de proliferação celular pode ser avaliada pela análise do índice mitótico, regiões organizadoras nucleolares (AgNors), **antigénio Ki-67**, Antígeno de Proliferação Nuclear (PCNA) (Stein *et al.*, 1998), 3H-tiamidina, Bromodesoxiuridina (BrdU) e citometria de fluxo (Mellon *et al.*, 1990).

O anticorpo monoclonal anti-Ki-67, descrito pela primeira vez por Gerdes *et al.* (1983), reconhece selectivamente um antigénio nuclear resistente à fixação (McCormick *et al.*, 1993), presente em células em proliferação (Okamura *et al.*, 1990; Stavropoulos *et al.*, 1993; Wrobel *et al.*, 1996). Esta proteína nuclear não histona (345-395 kD) (Gerdes *et al.*, 1991) está envolvida na replicação do ADN (Wright *et al.*, 1995; Stein *et al.*, 1998) e é expressa em todas as fases do ciclo celular, com excepção da fase G₀ (Okamura *et al.*, 1990; Gerdes *et al.*, 1991; Schlter *et al.*, 1993; Wrobel *et al.*, 1996; Tsuji *et al.*, 1997) e início de G₁ (Mellon *et al.*, 1990; Veronese *et al.*, 1993; Wrobel *et al.*, 1996), sendo considerada um bom marcador da fracção de crescimento em várias neoplasias (Mellon *et al.*, 1990; Tsujihashi *et al.*, 1991; Fradet, 1992; Fradet e Cordon-Cardo, 1993; Schlter *et al.*, 1993; Stavropoulos *et al.*, 1993; Krüger e Müller., 1995; Wright *et al.*, 1995). O antigénio não se detecta durante os processos de reparação do ADN (Schlter *et al.*, 1993) e a sua expressão decresce rapidamente após a mitose devido à sua semi-vida biológica de 1-2 horas (McCormick *et al.*, 1993; Schlter *et al.*, 1993; Wrobel *et al.*, 1996). O seu *locus* genético tem sido assinalado no cromossoma 10 (Tsuji *et al.*, 1997).

O índice de Ki-67 correlaciona-se com o crescimento de muitas neoplasias humanas (Krüger e Müller, 1995; Tsuji *et al.*, 1997). Vários investigadores referiram a existência de uma correlação entre o aumento da sua expressão com o estadio e o grau de carcinomas vesicais

(Mulder *et al.*, 1992; Fradet e Cordon-Cardo, 1993; Stavropoulos *et al.*, 1993; Tsuji *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998). No nosso estudo as neoplasias transicionais apresentaram um valor mediano de células marcadas pelo anticorpo Ki-67 de 14,8%, variando os valores entre 0,8 a 73,0%, intervalo de variação superior ao referido por Wright *et al.* (1-47%) (Wright *et al.*, 1995). Nesta série 48,9% das neoplasias apresentaram índice de Ki-67 superior a 15%. Os carcinomas papilares de baixo grau tinham tendência a apresentar fracção proliferativa baixa, enquanto os carcinomas de alto grau, papilares e nodulares, apresentaram-se mais proliferativos ($p < 0,0001$), o que está de acordo com a generalidade da bibliografia analisada.

Tal como foi referido por outros estudos (Tachibana *et al.*, 1991; Mulder *et al.*, 1992; Krüger e Müller, 1995), observámos diferenças significativas entre o índice de Ki-67 dos carcinomas invasores e não invasores ($p < 0,0001$). As neoplasias invasoras, principalmente de alto grau, tendiam a apresentar valores de Ki-67 mais altos que as papilares de baixo grau, menos invasoras. Verificámos ainda existirem diferenças entre os carcinomas que invadiam a camada muscular própria e os carcinomas que apenas invadiam o córion, apresentando os primeiros índices mais elevados; estas diferenças foram também verificadas em outros estudos (Mulder *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1995), apesar de alguns não o observarem (Lianes *et al.*, 1998).

Encontrámos ainda associação significativa entre os valores de Ki-67 e o índice mitótico ($p < 0,0001$), a permeação linfática ($p = 0,0002$) e as áreas de necrose no seio da massa neoplásica ($p < 0,0001$), parâmetros patológicos comuns nas neoplasias de alto grau e habitualmente associados a maior agressividade biológica.

O componente transicional dos carcinomas de padrão bifásico apresentou índice de Ki-67 idêntico ao dos carcinomas transicionais e o componente adenocarcinoma apresentou também fracção baixa de células em replicação.

Neste estudo observámos ainda diferenças significativas entre a fracção de crescimento das neoplasias, das lesões de hiperplasia e do urotélio normal, o que está de acordo com outros estudos (Limas, 1993; Stavropoulos *et al.*, 1993; Krüger e Müller, 1995).

O antígeno carcinoembrionário (CEA), é uma glicoproteína membranar de natureza mucinosa (Cordon-Cardo *et al.*, 1992) de 180 kD (Heyderman *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1998), membro da superfamília das imunoglobulinas (Bergeron *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1998). A sua síntese é reprimida no segundo trimestre da vida embrionária, mas pode reaparecer no período pós-natal em consequência de indiferenciação celular associada a estímulos oncogénicos (Jakse

et al., 1983). Inicialmente descrito como biomarcador de neoplasias malignas do tracto gastrointestinal (Shevchuk *et al.*, 1981; Jakse *et al.*, 1983; Heyderman *et al.*, 1984; Sakai *et al.*, 1993; LaRue *et al.*, 1997), verificou-se mais tarde estar associado com outras neoplasias epiteliais, nomeadamente prostáticas, vesicais (Shevchuk *et al.*, 1981, Heyderman *et al.*, 1984; Sakai *et al.*, 1993), pancreáticas, alguns carcinomas de mama e pequenas células do pulmão (LaRue *et al.*, 1997). Actualmente são conhecidos pelo menos 29 genes da família deste antigénio oncofetal (Bergeron *et al.*, 1996).

O CEA é produzido pelo urotélio (Tailly *et al.*, 1983) sendo expresso por 30 a 82% das neoplasias transicionais (Shevchuk *et al.*, 1981; Vogel *et al.*, 1988). A sua formação nas neoplasias não é uniforme o que se reflecte na frequência, na distribuição tecidual e na intensidade de marcação (Shevchuk *et al.*, 1981; Jautzke *et al.*, 1982). O CEA pode ser detectado no citoplasma, na membrana plasmática (Jakse *et al.*, 1983; Vogel *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1998) e nas membranas das células de revestimento luminal (Shevchuk *et al.*, 1981). Esta tendência de marcação nos contactos celulares sugere uma função na adesão celular (LaRue *et al.*, 1997) que foi já comprovada por estudos *in vitro* (Screaton *et al.*, 1997). Com a indiferenciação celular e invasão a marcação membranar diminui, havendo tendência a aumentar a expressão citoplasmática (Jakse *et al.*, 1983). No nosso estudo observámos imunoreactividade ao CEA em 40,4% das neoplasias transicionais, valor similar aos referidos pela bibliografia analisada, e próximos aos detectados por Heyderman (35%) e Wahren (48%) (Heyderman *et al.*, 1998).

Há evidências que a sobre-expressão desta molécula bloqueia a diferenciação celular (Screaton *et al.*, 1997). Vários investigadores referiram a existência de correlação entre a expressão de CEA e a anaplasia e invasão em carcinomas transicionais (Tailly *et al.*, 1983; Vogel *et al.*, 1988; Jautzke e Altenaehr, 1997; Moreno Sierra *et al.*, 1997). No nosso estudo observámos também imunomarcção predominantemente em carcinomas de alto grau e em neoplasias que invadiam profundamente a parede vesical, tendo os carcinomas papilares de baixo grau expressão menor. Contudo, outros investigadores não encontraram qualquer associação entre a reactividade ao CEA e a indiferenciação (Jakse *et al.*, 1983; Tailly *et al.*, 1983) e outros referiram mesmo maior expressão em neoplasias papilares superficiais, bem diferenciadas (Jakse *et al.*, 1983; LaRue *et al.*, 1997).

A imuno-expressão observou-se predominantemente no citoplasma e nas camadas médias e superficiais do urotélio, o que já foi descrito em outros estudos (Jautzke e Altenaehr, 1997). As neoplasias papilares de baixo grau apresentaram com maior frequência

positividade no revestimento apical do urotélio, evento já referido por Bergeron *et al.* (Bergeron *et al.*, 1996). Neste estudo observámos associação significativa entre a expressão citoplasmática e a invasão da parede vesical.

Nas neoplasias bifásicas, o componente adenocarcinoma revelou positividade intensa, multifocal ou difusa, mas a imunoreactividade foi escassa nas áreas transicionais.

A imunoreactividade à **vimentina** ocorreu em 36,2% das neoplasias transicionais, tendo sido detectada com maior frequência em carcinomas de alto grau de características invasoras e com fracção de crescimento elevada, o que já foi também referido em outros carcinomas, nomeadamente mamários (Domagala *et al.*, 1990). A expressão deste marcador conjuntivo pelas células carcinomatosas revela menor diferenciação celular, não se observando imunoreactividade no urotélio não neoplásico. Os carcinomas bifásicos foram também negativos a este marcador.

As **moléculas de adesão celular** desempenham papel crítico durante a embriogénese (Pignatelli, 1993; Lipponen *et al.*, 1996; Shiozaki *et al.*, 1996; Jankowski *et al.*, 1996) e no estado adulto, na regulação da diferenciação celular (Lipponen *et al.*, 1996), manutenção da integridade e da fisiologia dos tecidos (Mayer *et al.*, 1993; Jeffers *et al.*, 1997; Nakanishi *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998). Têm ainda acção fundamental no processo de carcinogénese e biologia tumoral (Paul *et al.*, 1997).

Durante a progressão a célula adquire propriedades malignas como crescimento excessivo, migração, invasão e poder metastático, o que envolve interacções entre as células malignas e os tecidos normais adjacentes (Hamada *et al.*, 1998). As moléculas de adesão intervêm neste processo de várias formas. Algumas como as caderinas mantêm a homeostasia pela manutenção dos contactos celulares, outras como o CD44, as integrinas e a superfamília das imunoglobulinas são necessárias para a migração, invasão e metastização. As moléculas de adesão actuam como supressores ou promotores da carcinogénese (Hamada *et al.*, 1998).

São conhecidas várias famílias de moléculas de adesão celular (caderinas, selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas) (Bringuier *et al.*, 1993; Vet *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998), sendo de particular interesse a família das caderinas, receptores membranares cuja função é essencial para manutenção da integridade estrutural e funcional

da maioria dos tecidos adultos (Elangbam *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998). Estas glicoproteínas medeiam a adesão celular por meio de interações homofílicas e homotípicas, dependentes do cálcio (Pignatelli *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1995; Lipponen *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 1997; Mialhe *et al.*, 1997; Richmond *et al.*, 1997).

Foram descritas várias classes de caderinas, das quais a caderina E parece ser o principal mediador de adesão, diferenciação e manutenção da integridade epitelial (Vleminckx *et al.*, 1991; Pignatelli *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1996; Elangbam *et al.*, 1997; Richmond *et al.*, 1997). Esta proteína, também designada de L-CAM, Uvomorulina, Arc-1 e cell-CAM 120/80 (Bringuier *et al.*, 1993; Pignatelli, 1993), é uma glicoproteína de 120 kD (Vleminckx *et al.*, 1991; Vet *et al.*, 1994; Syrigos *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1996; Smith e Pignatelli, 1997) que actua como molécula supressora da invasão (Vleminckx *et al.*, 1991; Bringuier *et al.*, 1993; Vet *et al.*, 1994; Shimazui *et al.*, 1996; Smith e Pignatelli, 1997; Stein *et al.*, 1998) e metastização (Hong *et al.*, 1995). O gene que a codifica parece actuar como um gene supressor (Griffiths *et al.*, 1996).

As células epiteliais não neoplásicas apresentam imuno-expressão uniforme na membrana celular, em particular nas junções intercelulares (Bringuier *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1996, Shiozaki *et al.*, 1996, Richmond *et al.*, 1997) não apresentando imunoreactividade a porção da membrana celular em contacto com a membrana basal (Griffiths *et al.*, 1996) e a superfície luminal do urotélio na maioria das células em “umbrella” (Syrigos *et al.*, 1995). Este padrão de marcação observa-se também em neoplasias bem diferenciadas. Contudo, no nosso estudo a marcação correu em apenas 4,8% das neoplasias transicionais observando-se principalmente no citoplasma, de forma difusa ou em grumos (“dott like”); este padrão de distribuição anómalo sugere alterações no processamento ou localização da proteína (Morton *et al.*, 1993), distúrbios nas interações das caderinas com o citoesqueleto (Bringuier *et al.*, 1993) ou pode ser um artefacto consequente da fixação do material com formaldeído (Ross *et al.*, 1995).

A marcação citoplasmática e ou heterogénea foi também referida em neoplasias esofágicas (Bringuier *et al.*, 1993), gástricas (Bringuier *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1997), de mama, ginecológicas (Bringuier *et al.*, 1993) e vesicais (Ross *et al.*, 1995; Syrigos *et al.*, 1995). A maioria dos estudos raramente refere marcação simultânea no citoplasma e membrana celular (Bringuier *et al.*, 1993) no entanto, 85,7% das neoplasias da nossa série, bem como a maioria das amostras de tecido não neoplásico, apresentaram este padrão de imunomarcação.

Neste trabalho, a imuno-expressão revelou-se heterogénea, o que pode ser justificada pela ocorrência de heterogeneidade tumoral (Shiozaki *et al.*, 1996), perda da expressão da

molécula, ou marcação inespecífica, visto o anticorpo utilizado (HECD-1) ser monoclonal e específico para antigénios humanos. Gostaríamos de realçar que as moléculas de caderina estão descritas em várias espécies de vertebrados (Paul *et al.*, 1997) sendo específicas de espécie, apesar de possuírem uma homologia interespecífica de 30 a 60% (Shiozaki *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1997). A redução da expressão pode estar também associada a supressão ou diminuição da transcrição do gene da caderina E (Morton *et al.*, 1993; Shiozaki *et al.*, 1996), alterações de translação (Otto *et al.*, 1994, Griffiths *et al.*, 1996; Paul *et al.*, 1997), clivagem proteolítica dos péptidos de caderina ou mutação genética (Morton *et al.*, 1993; Shiozaki *et al.*, 1996). A perda alélica de 16q, locus do gene (Umbas *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 1997), foi detectada em neoplasias de mama (Otto *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 1997), próstata (Umbas *et al.*, 1994; Otto *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1996) estômago (Umbas *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 1997) endométrio (Umbas *et al.*, 1994), mas não na bexiga humana (Bringuier *et al.*, 1993).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a perda de caderina E é um passo crítico para a aquisição de comportamento invasor (Vleminckx *et al.*, 1991; Otto *et al.*, 1994; Hong *et al.*, 1995; Paul *et al.*, 1997) e metastático (Vet *et al.*, 1994; Lipponen *et al.*, 1996; Richmond *et al.*, 1997, Stein *et al.*, 1998). A expressão de caderina E está diminuída em vários carcinomas humanos (Mayer *et al.*, 1993), e inúmeros estudos clínico-patológicos demonstrado a existência de associação entre a perda de expressão, estadios avançados e graus histológicos elevados em carcinomas mamários (Pignatelli *et al.*, 1994; Syrigos *et al.*, 1995; Smith e Pignatelli, 1997), gástricos (Nakanishi *et al.*, 1997; Smith e Pignatelli, 1997), esofágicos (Smith e Pignatelli, 1997), pancreáticos (Syrigos *et al.*, 1995; Smith e Pignatelli, 1997) colorectais, prostáticos (Pignatelli *et al.*, 1994, Syrigos *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 1997; Nakanishi *et al.*, 1997; Umbas *et al.*, 1997), de cabeça e pescoço (Otto *et al.*, 1994; Pignatelli *et al.*, 1994; Syrigos *et al.*, 1995; Smith e Pignatelli, 1997) e vesicais (Pignatelli *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1995; Syrigos *et al.*, 1998; Griffiths *et al.*, 1996, Cohen *et al.*, 1997; Nakanishi *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998). Contudo, outros estudos em carcinoma vesicais não encontraram associação entre a expressão de caderina E e o estadio ou o grau (Paul *et al.*, 1997). Neste trabalho a totalidade da nossa amostra de neoplasias papilares de baixo grau apresentou positividade à caderina E, enquanto 22,2 % das neoplasias papilares e nodulares de alto grau não apresentaram imuno-expressão, o que está de acordo com vários estudos que associaram a perda ou desregulação desta proteína e a indiferenciação celular (Pignatelli, 1993; Ross *et al.*, 1995). Todos os carcinomas bifásicos analisados apresentaram imunorreactividade a esta glicoproteína.

No nosso estudo não observámos diferenças acentuadas entre carcinomas transicionais de crescimento infiltrativo e não infiltrativo, o que já foi referido por outros autores (Ross *et*

al. 1995). Outros estudos observaram também correlação entre a diminuição da expressão e o aumento das dimensões, progressão neoplásica (Ross *et al.*, 1995; Syrigos *et al.*, 1995; Griffiths *et al.*, 1996; Smith e Pignatelli, 1997), envolvimento ganglionar e metástases à distância (Nakanishi *et al.*, 1997).

Verificámos com alguma frequência que carcinomas pouco diferenciados e infiltrativos apresentavam imunorreactividade citoplasmática à caderina E, evento que tem sido referido em vários estudos (Mayer *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 1993; Umbas *et al.*, 1994; Shiozaki *et al.*, 1996). Tal pode dever-se à produção de uma proteína afuncional cujos epítopes são reconhecidos pelo anticorpo HECD-1 (Pignatelli *et al.*, 1993; Jeffers *et al.*, 1997) ou distúrbios na interacção catetina-caderina (Otto *et al.*, 1994; Morton *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1997, Richmond *et al.*, 1997). A função da caderina é mediada por um grupo de proteínas citoplasmáticas designadas catetinas (Alfa, Beta e Gama) que conectam o domínio intracelular da caderina aos microfilamentos do citoesqueleto (Morton *et al.*, 1993; Pignatelli *et al.*, 1993; Syrigos *et al.*, 1995; Shimazui *et al.*, 1996; Mialhe *et al.*, 1997; Paul *et al.*, 1997; Richmond *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998). Alterações estruturais ou funcionais destas proteínas reguladoras podem conduzir à inactivação funcional da caderina-E na ausência de perda de expressão (Morton *et al.*, 1993; Umbas *et al.*, 1994; Shimazui *et al.*, 1996; Jeffers *et al.*, 1997; Umbas *et al.*, 1997) como foi referido no cancro gástrico (Bringuier *et al.*, 1993; Morton *et al.*, 1993) e prostático (Morton *et al.*, 1993; Jeffers *et al.*, 1997). As células expressam caderina E mas apresentam adesividade diminuída, sendo esta incrementada após transfecção de cADN de catetina (Pignatelli *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 1997). Pequenas variações na combinação, concentração, função e distribuição das catetinas podem conduzir à transformação neoplásica das células (Jankowski *et al.*, 1996). Em neoplasia vesicais o valor prognóstico destas proteínas é idêntico ao das caderinas (Shimazui *et al.*, 1996).

Estes resultados parecem confirmar que os estudos de imunocitoquímica da caderina E subestimam a extensão das alterações funcionais e estruturais do sistema de adesão celular caderina/catetina nas células malignas (Jeffers *et al.*, 1997). É pouco provável que processos biológicos tão complexos como a diferenciação, invasão e metastização, sejam regulados por uma única molécula (Pignatelli *et al.*, 1993; Pignatelli, 1994; Jeffers *et al.*, 1997). A aquisição de características fenotípicas que favorecem a invasão provavelmente requer interacções complexas e múltiplas entre membros de moléculas de adesão (Pignatelli *et al.*, 1994; Jeffers *et al.*, 1997). São pois necessárias investigações de outras proteínas envolvidas na invasão e metastização, como proteases e inibidores proteicos, moléculas de adesão heterotípicas e factores de motilidade (Hong *et al.*, 1995).

O gene **TP53** é gene supressor com locus no cromossoma 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD envolvida no controle do ciclo celular (Thomas *et al.*, 1993; Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Bartsch e Hietanen, 1996; Chern *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Tsuji *et al.*, 1997; Raitanen *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998), da diferenciação celular, da integridade do genoma e da apoptose em resposta a um estímulo genotóxico (Chern *et al.*, 1996; Cordon-Cardo *et al.*, 1997b; Lyons e Clarke, 1997; Orntoft e Wolf, 1997; Wolf *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 1999). As mutações no gene TP53 são comuns na maioria das neoplasias humanas (Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 1995; Bartsch e Hietanen, 1996; Chern *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999).

A proteína p53 normal (“wild”) é capaz de suprimir a proliferação celular e transformação neoplásica (Reznikoff *et al.*, 1996; Shiina *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1997). Pensa-se que o gene TP53 mantenha a integridade do genoma, iniciando uma cascata de eventos em resposta a estímulos genotóxicos, impedindo a replicação do erro genético (Reznikoff *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999) ou induzindo apoptose (Thomas *et al.*, 1993; Caliskan *et al.*, 1996; Raitanen *et al.*, 1997).

A inativação ocorre frequentemente associada a deleções do alélo 17p (Presti *et al.*, 1991; Cotran *et al.*, 1999) ou por mutação pontual em vários exões do gene. Existem domínios do gene TP53 entre os exões 5 e 8 que são altamente conservados na escala filogenética e 98% das mutações pontuais humanas ocorrem nesta região (Reznikoff *et al.*, 1996; van Leeuwen *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1997). Dois eventos distintos podem ocorrer: a proteína mutada tem efeito dominante mesmo na presença de proteína “wild” funcional (Thomas *et al.*, 1993; Reznikoff *et al.*, 1996; Shiina *et al.*, 1996) ou a p53 mutada, afuncional, ganha estabilidade (Thomas *et al.*, 1993; Griffiths *et al.*, 1995; Chern *et al.*, 1996; Reznikoff *et al.*, 1996; Shiina *et al.*, 1996; Cordon-Cardo *et al.*, 1997b; Tsuji *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998) e forma complexos com a proteína “wild” com perda da sua actividade reguladora (Wright *et al.*, 1995; Caliskan *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 1997). Se ocorre inativação do gene TP53 a célula, menos estável em termos genéticos, irá acumular mutações podendo ocorrer a selecção de clones malignos (Thomas *et al.*, 1993; Bartsch e Hietanen, 1996).

No homem a sobre-expressão nuclear de proteína p53 é geralmente aceite como evidência de mutação no gene Tp53 (Cordon-Cardo *et al.*, 1994; Wright *et al.*, 1995; Ordóñez e Rosai, 1996; Cordon-Cardo *et al.*, 1997b; Tsuji *et al.*, 1997; Wolf *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998). Contudo, alguns estudos não observaram associação entre a sobre-expressão nuclear de p53 e a perda da heterozigotia para 17p, nem com a detecção de mutações por SSCP (Cordon-Cardo *et al.*, 1997a);

o aumento da detecção de proteína p53 pode apenas reflectir lesão genómica (Wright *et al.*, 1995; Wolf *et al.*, 1997).

A ausência de imunoreactividade à proteína p53 não é sinónimo de ausência de mutação (Raitanen *et al.*, 1997; Cordon-Cardo *et al.*, 1997b). Algumas mutações induzem formação de proteínas inviáveis ou instáveis, rapidamente degradadas (Cordon-Cardo *et al.*, 1997b; Wolf *et al.*, 1997).

Mutações do TP53 são comuns em carcinomas transicionais humanos e vários estudos referem a sua correlação com o grau, o estadio e a progressão da doença (Presti *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1995; Reznikoff *et al.*, 1996; Shiina *et al.*, 1996; Stein *et al.*, 1996; Cordon-Cardo *et al.*, 1997b; Cotran *et al.*, 1999).

No nosso estudo não observámos imunoreactividade à proteína p53 mas, carcinomas epidermóides da terceira pálpebra de bovinos evidenciaram imunomarcagem nuclear. A ausência de marcação pode ser justificada por: 1) incapacidade do anticorpo em detectar proteínas p53 mutadas (por perda da antigenicidade da proteína devido à fixação) ou incapacidade em reconhecer os epitopes da proteína p53 bovina; 2) ocorrência de mutação não associada a produção de proteínas ou com formação de proteínas instáveis; 3) mutação em áreas do genoma não conservadas associadas a produção de proteínas não detectáveis pelo anticorpo usado; 4) ausência de mutação no gene TP53.

A realização de estudos de citogenética e biologia molecular são pois necessários para esclarecer a importância deste gene no mecanismo de tumorigénese das neoplasias uroteliais bovinas.

A instabilidade genética das células neoplásicas reflecte-se em aberrações cromossómicas e de ploidia (Bane *et al.*, 1996; Nanning *et al.*, 1997) que estão implicadas na patogenia, progressão (Fradet, 1992; Sasaki *et al.*, 1995) e metastização de várias neoplasias (Vindeløv *et al.*, 1995), nomeadamente de bexiga (Merkel *et al.*, 1987).

Apesar das alterações da **ploidia de ADN** se relacionarem com o grau citológico e histológico das neoplasias (Farsund *et al.*, 1984), nem sempre o seu comportamento biológico é previsível pelos parâmetros histológicos convencionais (Auer *et al.*, 1980; Schapers *et al.*, 1993; Auer *et al.*, 1995; Vindeløv *et al.*, 1995).

Os estudos iniciais de citometria de fluxo demonstraram que a aneuploidia de ADN ocorre em aproximadamente 66% das neoplasias sólidas (Böcking *et al.*, 1994) e está

correlacionada com a malignidade (Têtu *et al.*, 1987; Fradet, 1992; Stöckle *et al.*, 1993; van der Poel *et al.*, 1997). Não é contudo sinónimo de malignidade ou de alteração nuclear irreversível (Murphy, 1992; Auer *et al.*, 1995) e muitas neoplasias de alto grau, estadio avançado ou metastáticas apresentam conteúdo de ADN diplóide (Chin *et al.*, 1985; Murphy, 1992). Vários estudos demonstraram que as alterações citológicas e histológicas das neoplasias são precedidas por alterações da ploidia de ADN, detectadas muitos anos antes da transformação maligna (Auer *et al.*, 1989; Norming *et al.*, 1992b; Böcking *et al.*, 1994). Neoplasias benignas, lesões pré-cancerosas e mesmo lesões reactivas podem possuir conteúdo aneuplóide de ADN (De Vita *et al.*, 1991), o que sugere que a aneuploidia é um evento precoce no processo de tumorigénese (De Vita *et al.*, 1991) e reflecte distúrbios no genoma que estão correlacionados com o aumento do risco de transformação maligna (Auer *et al.*, 1989)..

Vários estudos de citometria de imagem e de fluxo encontraram associação entre a ploidia de ADN e o grau histológico (Merkel *et al.*, 1987; Koss *et al.*, 1989; De Vita *et al.*, 1991; Campanella *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1993; Clemo *et al.*, 1994; van Velthoven *et al.*, 1995; Ordóñez e Rosai, 1996; Nenning *et al.*, 1997; Ioakim-Liossi *et al.*, 1999), a invasão da parede vesical (Koss *et al.*, 1989; Campanella *et al.*, 1992; Vindeløv *et al.*, 1995; Nenning *et al.*, 1997; Ioakim-Liossi *et al.*, 1999), a permeação vascular (Bittard *et al.*, 1996), a metastização (Lee *et al.*, 1994; Raitanen *et al.*, 1997), a recorrência (Koss *et al.*, 1989; Fradet, 1992; Miao *et al.*, 1992; Böcking *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994) e a progressão da doença (Merkel *et al.*, 1987; Masters *et al.*, 1989; Nenning *et al.*, 1997). Contudo outros autores não encontraram associação entre a ploidia de ADN, o grau ou o estadio (Thomas *et al.*, 1993; Vindeløv *et al.*, 1995) ou o comportamento metastático (Lianes *et al.*, 1998).

No nosso estudo 71,1% dos carcinomas transicionais apresentaram **conteúdo de ADN** aneuplóide e apenas 28,9% eram diplóides de ADN, valores próximos aos referidos pela maioria dos estudos de citometria de imagem (Stöckle *et al.*, 1991; Scharpers *et al.*, 1993; Lianes *et al.*, 1998). Das neoplasias aneuplóides de ADN, 12,5% possuíam mais de um clone de células aneuplóides, valor muito inferior ao observado em alguns estudos de citometria de fluxo onde são referidas frequências relativas de carcinomas multiplóides de ADN entre 22% e 87,5% (Masters *et al.*, 1989; De Vita *et al.*, 1991; Campanella *et al.*, 1992; Sasaki *et al.*, 1992). As neoplasias multiplóides de ADN estão associadas a comportamento biológico mais agressivo (Masters *et al.*, 1989; Campanella *et al.*, 1992; Norming *et al.*, 1992a; Norming *et al.*, 1992b;

Vindeløv *et al.*, 1995) o que está de acordo com os nossos resultados, como exporemos adiante.

As neoplasias diplóides de ADN ocorreram principalmente no grupo dos carcinomas de baixo grau, de morfologia papilar. A frequência relativa de aneuploidia de ADN foi similar nos grupos neoplásicos de baixo e alto grau. Todas as neoplasias multiplóides de ADN eram lesões de alto grau, 3 (75%) possuíam morfologia nodular ou mista e 1 padrão papilar invertido. Estas observações confirmam a generalidade dos resultados referidos na literatura (Farsund *et al.*, 1984; Wijkström *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 1991; Cordon-Cardo *et al.*, 1992) e revelam que o pleomorfismo celular e padrão de cromatina grumosa são geralmente reflexo de aneuploidia de ADN, enquanto núcleos monómórficos com cromatina fina e homogênea estão geralmente associados a conteúdo diplóide de ADN (Murphy, 1997).

Os carcinomas diplóides de ADN apresentavam morfologia papilar em 92,3% dos casos mas, 70% dos carcinomas aneuplóides de ADN também possuíam crescimento papilar. Apenas uma lesão nodular era diplóide de ADN. A associação entre a ploidia e o padrão de crescimento é interessante e significativa; o facto de a maioria das neoplasias não papilares serem aneuplóides de ADN pode estar relacionado com a evolução clínica desfavorável deste grupo neoplásico (De Vita *et al.*, 1991). Contudo, algumas neoplasias papilares de baixo grau apresentam conteúdo de ADN elevado, enquanto algumas papilares de grau e estadio altos possuem conteúdo de ADN diplóides, o que confirma que o padrão morfológico não é indicador independente do comportamento biológico (Campanella *et al.*, 1992; van Velthoven *et al.*, 1995).

No nosso estudo, assim como o referido em vários estudos de citometria de imagem e de fluxo, as neoplasias aneuplóides de ADN apresentaram maior tendência a invadir a parede vesical (Wijkström *et al.*, 1984; De Vita *et al.*, 1991; Tachibana *et al.*, 1991; Koss e Czerniak, 1992; Stöckle *et al.*, 1993) e de invadir a camada muscular própria (Wijkström *et al.*, 1984; Tachibana *et al.*, 1991; Koss e Czerniak, 1992). Salientaram-se as neoplasias multiplóides de ADN que apresentaram invasão da muscular própria em 100% dos casos. Apenas 3 carcinomas diplóides de ADN invadiram o córion, 2 das quais invadiram também a camada muscular própria. Estes resultados indicam que as neoplasias diplóides de ADN, predominantemente de baixo grau, não são invasoras ou raramente progridem além da lâmina própria (Wijkström *et al.*, 1984; Koss e Czerniak, 1992).

Em relação aos carcinomas que infiltraram o córion, 39,3% eram aneuplóides de ADN, valor compreendido nos referidos na literatura consultada que variam entre 19,3% e 56% (Chin *et al.*, 198). A ocorrência de aneuploidia nestas neoplasias pode justificar o seu

comportamento imprevisível, a recorrência local e a invasão muscular que por vezes apresentam (Hug *et al.*, 1992). Contudo existem carcinomas vesicais restritos ao urotélio ou com invasão superficial que são aneuplóides de ADN mas não progridem e algumas neoplasias diplóides que evoluem de forma adversa (van Velthoven *et al.*, 1995).

Os carcinomas invasores da camada muscular própria não possuem necessariamente conteúdo de ADN aneuplóide, o que está de acordo com o nossos resultados e observações de outros investigadores (Chin *et al.*, 1985). Jakobson *et al.* (1989), Kossa e Kaalhus (1985) e Blomjourns *et al.* (1988) encontraram neoplasias diplóides de ADN com frequências entre 17 e 33% (Masters *et al.*, 1989; Hug *et al.*, 1992).

A permeação vascular ocorreu com frequências idênticas nas neoplasias diplóides e aneuplóides de ADN, mas foi mais comum nas neoplasias multiplóides de ADN. A metastização foi detectada exclusivamente em carcinomas aneuplóides e multiplóides de ADN, apesar de alguns estudos observarem neoplasias metastáticas diplóides de ADN.

Estas lesões invasivas e aneuplóides têm tendência a apresentar células menos diferenciadas (Nenning *et al.*, 1997) e índices de proliferação elevados (Tachibana *et al.*, 1991; Mulder *et al.*, 1992), o que está de acordo com os valores dos índices de proliferação celular por nós observados (índice mitótico e de Ki-67). Todas as neoplasias multiplóides de ADN e metade das neoplasias aneuplóides de ADN apresentaram valores Ki-67 altos (superiores a 15%), mas as neoplasias diplóides de ADN apresentaram menores taxas proliferativas. Todos os carcinomas com invasão profunda da parede vesical apresentavam índice de Ki-67 alto. Constata-se assim que as neoplasias mais agressivas são aneuplóides e multiplóides de ADN e quanto mais agressiva, maior é a taxa de proliferação (De Vita *et al.*, 1991; Mulder *et al.*, 1992).

O **Índice de ADN (ID)** das neoplasias transicionais variou entre 0,9 e 4,79, convencendo-se que ID=1 ocorre em carcinomas diplóides de ADN. Relativamente ao ID verificámos a existência de uma associação estatisticamente significativa entre este parâmetro citométrico e o grau histológico, tal como detectado por outros investigadores (van Velthoven *et al.*, 1995). Os carcinomas de ID alto pertenciam predominantemente ao grupo de carcinomas de alto grau, tendiam a apresentar morfologia nodular ou mista ($p=0,002$), possuíam frequentemente necrose ($p=0,05$) e infiltravam a parede vesical ($p=0,02$), ocorrendo invasão da camada muscular própria em 45,5% dos carcinomas de ID alto ($p=0,005$); frequentemente observaram-se êmbolos vasculares e apresentavam valores

altos dos índices mitótico ($p=0,002$) e de antigénio Ki-67 ($p=0,0025$). A metastização ocorreu exclusivamente nas neoplasias de ID alto, mas não ocorreu uma associação estatisticamente significativa entre estes parâmetros, provavelmente devido ao reduzido tamanho da amostra. Estas neoplasias revelaram frequentemente imunorreactividade à vimentina ($p=0,03$), mas não se observou associação com a imuno-expressão de CEA e caderina E.

As neoplasias de ID baixo pertenciam ao grupo dos carcinomas de baixo grau, de morfologia papilar, não invasoras ou com invasão do córion, com índices proliferativos baixos. Alguns autores defendem que ID altos são preditivos do comportamento invasor (Vindeløv et al., 1995).

Em carcinomas transicionais a presença de células com conteúdo de ADN aberrante tem sido associada a grau histológico elevado (Norming et al., 1989; Rao et al., 1993). A detecção de células verdadeiramente aneuplóides (Stöckle et al., 1993; Böcking et al., 1994) $>5c$, $>8c$ e $>9c$ é importante por poderem ser marcadores de instabilidade e agressividade das neoplasias vesicais (Rao et al., 1993; van Velthoven et al., 1995). Vários estudos encontraram correlação entre o número de células $>5c$ com o grau (Schapers et al., 1993; van Velthoven et al., 1995), o estadio (Nenning et al., 1997) e a progressão da doença (Schapers et al., 1993). Quando associámos as variáveis citométricas $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$ com os vários parâmetros patológicos verificámos tendência dos carcinomas de baixo grau para possuírem estes parâmetros baixos, ou seja baixo número de células com conteúdo aberrante de ADN, e tendência dos carcinomas de alto grau a apresentarem valores altos para as mesma variáveis. Os carcinomas com estes parâmetros altos possuíam predominantemente morfologia nodular, apesar de existirem carcinomas de morfologia papilar com estes parâmetros altos. A necrose e invasão, índices proliferativos altos e positividade à vimentina ocorreram predominantemente em carcinomas com os parâmetros $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$ altos.

Como a fracção de células $>2,5c$ pode representar a fracção de proliferação, confirmamos que os carcinomas de baixo grau possuem baixa fracção de crescimento, enquanto os carcinomas de alto grau têm tendência a apresentar maior actividade replicativa.

Os carcinomas que apresentavam células com conteúdo de ADN $>5c$ eram maioritariamente aneuplóides de ADN (72,0%) e invasores (69,0%), pelo que este parâmetro citométrico pode estar conotado com evolução neoplásica adversa,

nomeadamente com invasão da parede vesical. Todos os carcinomas com células de conteúdo de ADN $>9c$ eram aneuplóides ou multiplóides, com excepção de 2 carcinomas diplóides de crescimento infiltrativo. A presença destas células aberrantes em carcinomas diplóides pode ser um marcador de agressividade biológica ou eventualmente podem constituir populações celulares de tal forma aberrantes que não são viáveis.

Esta associação entre valores altos de células verdadeiramente aneuplóides, o grau histológico e o estadio foi também observado em alguns estudos de citometria de fluxo (Scharpers *et al.*, 1993; Nenning *et al.*, 1997).

Todos os carcinomas bifásicos apresentaram conteúdo de ADN anómalo. Quatro carcinomas apresentaram conteúdo de ADN aneuplóide, quer no componente transicional quer no adenocarcinoma, contudo não se observaram núcleos com conteúdo de ADN muito aberrante ($>5c$, $>9c$). A neoplasia que no exame histológico revelou menor diferenciação nos dois componentes celulares, transicional e glandular, apresentou múltiplos clones aneuplóides no componente transicional e aneuploidia no componente adenocarcinoma. Esta neoplasia, mais anaplásica, possuía elevadas percentagens de células $>2,5c$, $>5c$ e $>9c$ quer no componente transicional quer no componente adenocarcinoma. É ainda de realçar que todas as neoplasias que invadiram a parede vesical apresentaram células uroteliais e glandulares com conteúdo de ADN nuclear superior a $5c$.

Classicamente a caracterização das neoplasias é realizada com base nas características citológicas e histológicas. Contudo, à medida que novos conhecimentos emergem, novas técnicas são usadas para apoiar o diagnóstico histológico, estabelecer o prognóstico e melhorar o conhecimento da história natural das neoplasias. A classificação histológica das neoplasias vesicais, baseada no grau de homologia com o urotélio não neoplásico, continua a ser o melhor meio de prever a sua evolução. Permite categorizar as neoplasias em função do grau de diferenciação celular, tendo subjacente o pressuposto que quanto menor for o grau de diferenciação da célula neoplásica, maior é a sua plasticidade, adaptabilidade e claro agressividade biológica. O padrão de crescimento é também um parâmetro importante a analisar, as neoplasias benignas possuem arquitectura papilar, bem como a maioria dos carcinomas de grau baixo; estes como nós verificámos, tendem a ser pouco invasores, pouco proliferativos e geralmente possuem conteúdo de ADN diplóide, enquanto as lesões de alto grau, preferencialmente de morfologia nodular e invasoras, possuem taxas de proliferação

altas e conteúdo de ADN anómalo. Os carcinomas de crescimento papilar invertido surgiram frequentemente associados a parâmetros patológicos conotados com agressividade. Apesar destas constatações, observámos alguns carcinomas de padrão papilar clássico altamente infiltrativo e alguns carcinomas nodulares pouco invasivos, pelo que pensamos que o padrão arquitetural não pode ser considerado como factor independente do grau de atipia citológica.

Em Medicina Humana os carcinomas bifásicos estão associados a evolução adversa. No nosso estudo, apesar de a maioria ter apresentado atipia citológica escassa, quer o componente transicional quer o adenocarcinoma apresentaram na totalidade da série, conteúdo de ADN anómalo o que pode revelar instabilidade genética aumentada, evento normalmente conotado com agressividade biológica. Contudo, o reduzido número da amostragem não nos permite tirar grandes ilações.

Apesar de não termos observado diferenças acentuadas na maioria dos marcadores de proliferação e diferenciação celular entre estes carcinomas e os carcinomas transicionais, pensamos que dada a exuberância e heterogeneidade morfológica relativamente aos transicionais puros, estas neoplasias devem ser classificadas como grupo independente, pelo que propomos a introdução deste tipo neoplásico na classificação de neoplasias vesicais animais.

A classificação da OMS para os animais domésticos (1974) é idêntica à classificação da OMS para Medicina Humana de 1973 e apesar das inúmeras propostas de alteração a esta classificação que surgiram em Medicina Humana, em particular na classificação dos carcinomas transicionais, em Medicina Veterinária não houve qualquer inovação. Contudo, como verificado na clínica humana, este sistema de avaliação cria um grupo de neoplasias de grau II amplo e heterogéneo, com comportamento biológico imprevisível (Carbin *et al.*, 1991; Decaestecker *et al.*, 1996; Murphy, 1997) e a maioria das neoplasias são consideradas malignas (Murphy, 1992) apesar de vários estudos clinico-patológicos terem verificado que a maioria dos carcinomas de grau I não progrediam, tendo surgido uma grande polémica quanto à sua malignidade biológica (Amin *et al.*, 1996).

No final de 1998 é publicado um sistema de classificação baseado na reunião de consenso da OMS e Sociedade Internacional de Patologia Urológica, que reconhece pela primeira vez um grupo de neoplasias uroteliais papilares de baixo potencial maligno (Epstein *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999), classe neoplásica é também considerada na classificação da OMS para Medicina Humana recentemente publicada (1999).

Este grupo das neoplasias papilares de baixo potencial maligno inclui algumas neoplasias grau I da classificação da OMS de 1973, com morfologia similar à do papiloma: lesões pequenas, solitárias, constituídas por células bem diferenciadas assemelhando-se às células transitórias normais, com atipia citológica e arquitetural mínima. Possuem mitoses raras mas a taxa de proliferação é superior à dos papilomas, o que se pode traduzir por um ligeiro aumento do número de camadas de células e ligeira perda de polaridade (Epstein *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999; Mostofi *et al.*, 1999).

Algumas das neoplasias observadas de padrão papilar clássico, com atipia citológica escassa, índice mitótico baixo idêntico ou menor que o do urotélio não neoplásico, não invasoras, que os estudos de citometria revelaram possuir conteúdo diplóide de ADN, deverão também ser incluídas neste novo grupo neoplásico, à semelhança do que ocorre em Medicina Humana.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O estudo realizado permitiu as seguintes conclusões:

- Os carcinomas transicionais de baixo grau apresentaram exclusivamente morfologia papilar e eram no geral não invasivos, enquanto que os carcinomas de alto grau, predominantemente de morfologia nodular ou padrão misto, tendiam a apresentar comportamento invasor. Os carcinomas de padrão papilar invertido associaram-se a características fenotípicas de agressividade biológica com frequência superior aos carcinomas papilares clássicos.

- Apesar do padrão arquitectural estar frequentemente associado às características de diferenciação celular e invasão, não é um parâmetro independente do grau histológico e do estadio na avaliação da história natural das neoplasias transicionais.

- O índice mitótico e de antigénio Ki-67 revelaram-se bons marcadores da actividade replicativa apresentando associação com o grau de diferenciação celular e com o comportamento invasor.

- A imunoexpressão de vimentina associou-se directamente com o grau a invasão e índices de proliferação altos. O CEA associou-se frequentemente a carcinomas de alto grau, invasores, apesar desta diferença não de não ter atingido significância estatística.

- Nos carcinomas de padrão bifásico, a exuberância e heterogeneidade de padrões morfológicos observados nas áreas de tipo adenocarcinoma leva-nos a sugerir a criação na classificação de Medicina Veterinária desta nova classe neoplásica.

- As neoplasias diplóides de ADN associaram-se a grau histológico e estadio baixos, padrão arquitectural papilar e índices de proliferação baixos, enquanto os carcinomas aneuplóides se associaram-se a grau e estadio altos, crescimento nodular e fracção de crescimento alta. Os carcinomas multiplóides de ADN revelaram sempre características conotadas com elevada agressividade biológica.

- A fracção de células verdadeiramente aneuplóides $>5c$ e $>9c$ pode permitir identificar carcinomas com maior risco de progressão, em particular .

- O ocorrência de aneuploidia em carcinomas de baixo grau e no urotélio não neoplásico é um indício que as alterações genéticas são evento precoce nos mecanismos de tumorigénese. Revela que o urotélio não neoplásico possui instabilidade genética.

- As associações estatisticamente significativas encontradas confirmam o valor do conteúdo de ADN, avaliado por citometria de imagem, no estudo das características biológicas das neoplasias vesicais bovinas.

ANEXOS

ANEXOS

Tabela 5: Associação entre as variáveis patológicas e o grau nuclear.

Parâmetros	Carcinomas Baixo Grau n (%)	Carcinomas Alto Grau n (%)	p
Multiplicidade:			
Ausente	10 (38,5)	11 (52,4)	0,34
Presente	16 (61,5)	10 (47,6)	
Coexistência com neoplasia vascular			
Não	17 (65,4)	13 (61,9)	0,81
Sim	9 (34,6)	8 (38,1)	
Crescimento			
Papilar	26 (100,0)	9 (42,9)	p<0,0001
Não papilar	0 (0,0)	10 (47,6)	
Misto	0 (0,0)	2 (9,5)	
Necrose			
Ausente	20 (76,9)	3 (14,3)	p<0,0001
Presente	6 (23,1)	18 (85,7)	
Invasão			
Não invasivo	19 (73,1)	1 (4,8)	p<0,0001
Invasivo	7 (16,9)	20 (95,2)	
Embolia			
Ausente	26 (100,0)	11 (52,4)	p<0,0001
Presente	0 (0,0)	10 (47,6)	
Metastização			
Ausente	26 (100,0)	19 (90,5)	0,19
Presente	0 (0,0)	2 (9,5)	
Áreas glandulares			
Ausente	6 (23,1)	8 (38,1)	0,26
Presente	20 (76,9)	13 (61,9)	
Áreas invertidas			
Ausente	10 (38,5)	1 (4,8)	0,012
Presente	16 (61,5)	20 (95,2)	
A sólidas			
Ausente	15 (57,7)	15 (71,4)	0,33
Presente	11 (42,3)	6 (28,6)	

Tabela 9 - Estudos de imunocitoquímica realizados na análise dos carcinomas transicionais.

Parâmetros	Carcinomas		p
	Baixo Grau n (%)	Alto Grau n (%)	
Vimentina			
Ausente	24 (92,3)	6 (28,5)	p<0,0001
Presente	2 (7,7)	15 (71,4)	
CEA (extensão)			
Negativo	16 (61,5)	12 (57,1)	0,67
Focal	0 (0,0)	0 (0,0)	
Multifocal	6 (23,1)	7 (33,3)	
Difuso	4 (15,4)	2 (9,5)	
CEA (local)			
Apical	0 (0,0)	0 (0,0)	0,069
Citoplasma	2 (20,0)	6 (66,7)	
Apical+citoplasma	8 (80,0)	3 (33,3)	
Caderina E (extensão)			
Negativo	0 (9,9)	2 (22,2)	0,075
Focal	5 (38,5)	2 (22,2)	
Multifocal	4 (30,8)	5 (55,6)	
Difuso	4 (30,8)	0 (0,0)	
Caderina E (local)			
Membrana	0 (0,0)	1 (12,5)	0,24
Citoplasma	2 (15,4)	0 (0,0)	
Citoplasma+membrana	11 (84,6)	7 (87,5)	

Tabela 13 - Associação entre a ploidia de ADN e os parâmetros patológicos.

Parâmetros	Ploidia de ADN		
	Diplóides n (%)	Aneuplóides n (%)	Multiplóides n (%)
Crescimento			
Papilar	12 (92,3)	20 (71,4)	1 (25,0)
Não papilar	1 (7,7)	8 (28,6)	3 (75,0)
Necrose			
Ausente	9 (69,2)	12 (42,9)	0 (0,0)
Presente	4 (30,8)	16 (57,1)	4 (100,0)
Invasão			
Ausente	8 (61,5)	10 (35,7)	0 (0,0)
Presente	5(38,5)	18 (64,3)	4 (100,0)
Embolia			
Ausente	11 (84,6)	23 (82,1)	1 (25,0)
Presente	2 (15,4)	5 (17,9)	3 (75,0)
Metástases			
Ausente	13 (100,0)	27 (96,4)	3 (75,0)
Presente	0 (0,0)	1 (3,6)	1 (25,0)
Vimentina			
Ausente	9 (69,2)	19 (67,9)	0 (0,0)
Presente	4 (30,8)	9 (32,1)	4 (100,0)
CEA			
Ausente	6 (46,2)	19 (67,9)	1 (25,0)
Presente	7 (53,9)	9 (32,1)	3 (75,0)
Caderina E			
Ausente	0 (0,0)	2 (18,2)	0 (0,0)
Presente	7 (100,0)	9 (81,8)	3 (100,0)

Tabela 17 - Associação entre o Índice de ADN e os parâmetros patológicos.

Parâmetros	ID		p
	Baixo n (%)	Alto n (%)	
Crescimento			
Papilar	21 (91,3)	12 (54,5)	0,05
Não papilar	2 (8,7)	10 (45,4)	
Necrose			
Ausente	14 (60,9)	7 (31,8)	0,05
Presente	9 (39,1)	15 (68,2)	
Invasão			
Ausente	13 (56,5)	5 (22,7)	0,021
Presente	10 (43,5)	17 (77,3)	
Embolia			
Ausente	20 (87,0)	15 (68,2)	0,17
Presente	3 (13,0)	7 (31,8)	
Metástases			
Ausente	2 (8,7)	20 (90,9)	0,23
Presente	21 (91,3)	2 (9,1)	
Vimentina			
Ausente	18 (78,3)	10 (45,5)	0,023
Presente	5 (21,7)	12 (54,5)	
CEA			
Ausente	15 (65,2)	11 (50,0)	0,30
Presente	34,8 (34,8)	11 (50,0)	
Caderina E			
Ausente	1 (9,1)	1 (10,0)	1
Presente	10 (90,9)	9 (90,0)	

Tabela 21 - Associação entre as variáveis citométricas >2,5c, >5c e >9c e os parâmetros patológicos.

	>2,5c		p	>5c		p	>9c		p
	Baixo	Alto		Baixo	Alto		Baixo	Alto	
Crescimento									
Papilar	21 (95,5)	12 (52,2)	0,001	22 (95,7)	11 (50,0)	0,0005	22 (95,7)	11 (50,0)	0,0005
Não papilar	1 (4,5)	11 (47,8)		1 (4,3)	11 (50,0)		1 (4,3)	11 (50,0)	
Necrose									
Ausente	16 (72,7)	5 (21,7)	0,0006	16 (69,6)	5 (22,7)	0,0002	16 (69,6)	5 (22,7)	0,0002
Presente	6 (27,3)	18 (78,3)		7 (30,4)	17 (77,3)		7 (30,4)	17 (77,3)	
Invasão									
Ausente	14 (63,6)	4 (17,4)	0,001	15 (65,2)	3 (13,6)	0,0004	15 (65,2)	3 (13,6)	0,0004
Presente	8 (36,4)	19 (82,6)		8 (34,8)	19 (86,4)		8 (34,8)	19 (86,4)	
Embolia									
Ausente	20 (90,9)	15 (65,2)	0,07	21 (91,3)	14 (63,6)	0,04	21 (91,3)	14 (63,6)	0,04
Presente	2 (9,1)	8 (34,8)		2 (8,7)	8 (36,4)		2 (8,7)	8 (36,4)	
Metástases									
Ausente	23 (100,0)	20 (90,9)	0,23	23 (100,0)	20 (90,9)	0,23	23 (100,0)	20 (90,9)	0,23
Presente	0 (0,0)	2 (9,1)		0 (0,0)	2 (9,1)		0 (0,0)	2 (9,1)	
Vimentina									
Ausente	18 (81,8)	10 (43,5)	0,008	20 (87,0)	8 (36,4)	0,0004	20 (87,0)	8 (36,4)	0,0004
Presente	4 (18,2)	13 (56,5)		3 (13,0)	14 (63,6)		3 (13,0)	14 (63,6)	
CEA									
Ausente	14 (65,2)	12 (52,2)	0,43	12 (52,2)	14 (63,6)	0,4	12 (52,2)	14 (63,6)	0,4
Presente	8 (34,8)	11 (47,8)		11 (47,8)	8 (36,4)		11 (47,8)	8 (36,4)	
Caderina E									
Ausente	1 (9,1)	1 (50,0)	0,9	0 (0,0)	2 (22,2)	0,09	0 (0,0)	2 (22,2)	0,09
Presente	10 (90,9)	1 (50,0)		12 (100,0)	7 (77,8)		12 (100,0)	7 (77,8)	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel PD. Prognostic indices in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* **62**:103-109, 1988.

Allard P, Bernard P, Fradet Y, Têtu B. The early clinical course of primary Ta e T1 bladder cancer: a proposed prognostic index. *Br J Urol* **81**:692-698, 1998.

Alonso AME: Bracken ptaquiloside in milk. *Nature* **382**: 587, 1996.

Amin MB, Murphy WM, Reuter VE, Ro JY, Ayala AG, Weiss MA, Eble JN, Young RH. Transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Anatomic Pathology* 1996, Fechner RE, Rosen PT (ed), vol 1, pp:2-39 ASCP,1996.

Amin MB, Murphy WM, Reuter VE, Ro JY, Ayala AG, Weiss MA, Eble JN, Young RH. A symposium on controversies in the pathology of transitional cell carcinomas of the urinary bladder, Part II. *Anatomic Pathology* 1997 Fechner RE, Rosen PT (ed), vol 2, pp:72-109 ASCP,1997.

Amin MB, Young RH. Intraepithelial lesions of the urinary bladder with a discussion of the histogenesis of urothelial neoplasia. *Semin Diagn Pathol* **14**:84-97, 1997.

Association of directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations for the reporting of urinary bladder specimens containing bladder neoplasms. *Hum Pathol* **27**:751-753, 1996.

Auer GU, Caspersson TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology* **2**:161-165, 1980.

Auer G, Askensten U, Ahrens O. Cytophotometry. *Hum Pathol* **20**:518-527, 1989.

Ayala AG, Ro JY: Premalignant lesions of the urothelium and transitional cell tumors. *Pathology of the Urinary Bladder*. Young R (Ed.), Churchill Livingstone, pp:89-90, 1989.

Bane BL, Rao JY, Hemstreet GP. Pathology and staging of bladder cancer. *Semin Oncol* **23**:546-570, 1996

Baker JF: A review of the importance of p53 gene in cancer research. <http://www.p53.htm>, 1996.

Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. *Environmental Health Perspectives* **104**:569-577, 1996.

Bergeron A, LaRue H, Fradet Y. Identification of a superficial bladder tumor-associated glycoform of the carcinoembryonic antigen by monoclonal antibody 19A211¹. *Cancer Res* **56**:908-915, 1996.

Bittard H, Lamy B, Billery C. Clinical evaluation of cell Deoxyribonucleic acid content measured by Flow cytometry in bladder cancer. *J Urol* **155**:1887-1891, 1996.

Blomjous CEM, Vos W, Schipper NW, Uyterlinde AM, Baak JPA, de Voogt HJ, Meijer CJLM. The prognostic significance of selective nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. *Hum Pathol* **21**:409-413, 1990.

Böcking A, Striepecke E, Auer H, Füzési L. Static DNA Cytometry. Biological background, technique and diagnostic interpretation. Compendium on the computerized cytology and histology laboratory. Wied GL, Bartels PH, Rosenthal DL, Schenck U (Ed), *Tutorials of cytology*, 107-138, 1994.

Bringuier JP, Umbas R, Schaafsma E, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* **53**:3241-3245, 1993.

Bringuier PP, Piaton E, Berger N, Debruyne F, Perrin P, Schalken J, Devonec M. Bracken fern-induced bladder tumors in Guinea pigs. A model for human neoplasia. *Am J Pathol* **147**:858-868, 1995.

Caliskan M, Türkeri LN, Mansuroglu B, Toktas G, Aksoy B, Ünlüer E, Akdas. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol* **79**:373-377, 1997.

Cajulis RS, Haines III GK, Frias-Hidvegi D, McVary K, Bacus JW. Cytology, Flow Cytometry, Image Cytogenetics by Fluorescence in situ Hybridization in the diagnosis of Transitional Cell Carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagnostic Cytopathology* **13**:214-224, 1995.

Caliskan M, Türkeri LN, Mansuroglu B, Toktas G, Aksoy B, Ünlüer E, Akdas. Nuclear accumulation of mutant p53 protein: a possible predictor of failure of intravesical therapy in bladder cancer. *Br J Urol* **79**:373-377, 1997.

Campanella R, Russo A, Plaja S, Bazan V, Pavone C, Corselli G, Pavone-Macaluso M. Study of cellular DNA content by flow cytometry in primary bladder carcinomas. Significance of monoclonal and multiclonal varieties of DNA aneuploidy. *Eur Urol* **21**:58-63, 1992.

Campo MS, Jarrett WF, Barron R, O'Neil BW, Smith KT: Association of Bovine Papillomavirus Type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Res* **52**:6898-6904, 1992.

Campo MS, O'Neil BW, Barron RJ, Jarrett FH. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. *Carcinogenesis* **15**:1597-1601, 1994.

Campo MS. Bovine Papillomavirus and cancer. *Vet J* **154**:175-188, 1997.

Carbin B-E, Ekman P, Gustafson H, Christensen NJ, Sandstedt B, Silfversward C. Grading of human urothelial carcinoma based on nuclear atypia and mitotic frequency. Histological description. *J Urol* **145**:968-971, 1991.

Cardellino U. Epithelial tumours. <http://www2.cba.unige.it/izsge/04vesc/04vesc.htm> 1993.

Chern H-D, Becich MJ, Persad RA, Romkes M, Smith P, Collins C, Li Y-W, Branch RA. Clonal analysis of human recurrent superficial bladder cancer by immunohistochemistry of P53 and Retinoblastoma proteins. *J Urol* **156**:1846-1849, 1996.

Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* **111**:345-358, 1999.

Chin JL, Huben RP, Nava E, Rustum YM, Greco JM, Pontes E, Frankfurt OS. Flow cytometric analysis of DNA content in human bladder tumors and irrigation fluids. *Cancer* **56**:1677-1681, 1985.

Clemo FA S, Crabtree WN, Walker E, DeNicola DB. Comparison of image analysis and flow cytometric measurements of DNA content of canine transitional cell carcinomas. *Vet Pathol* **15**:418-426, 1993.

Clemo FA S, DeNicola DB, Carlton WW, Morrison WB, Walker E. Flow cytometric DNA ploidy analysis in canine transitional cell carcinoma of urinary bladders. *Vet Pathol* **31**:207-215, 1994.

Cohen C, Tickman RJ, De Rose PB, Whitaker BP. DNA ploidy studies of benign and malignant tumours comparison of flow cytometry and image analysis techniques using two types of cytological specimen. *Cytopathology* **2**:247-259, 1991.

Cohen MB, Griebing TL, Ahaghotu CA, Rokhlin OW, Ross JS. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. *Am J Clin Pathol* **107**:56-63, 1997.

Cordon-Cardo C, Wartinger DD, Melamed MR, Fair W, Fradet Y. Immunopathological analysis of human urinary bladder cancer. *Am J Pathol* **140**:375-385, 1992.

Cordon-Cardo C, Dalbagni G, Sarkis AS, Reuter VE. Genetic alterations associated with bladder cancer. Important advances in Oncology. De Vita T, Hellman S, Rosenberg AS (Ed). J. B. Lippincott Co., pp:71-83. 1994.

Cordon-Cardo C, Sheinfeld J, Dalbagni G. Genetic studies and molecular markers of bladder cancer. *Sem Surg Oncol* **13**:319-327, 1997a.

Cordon-Cardo C, Zhang ZF, Dalbagni G, Drobnjak M, Charytonowicz E, Hu SX, Xu HJ, Reuter VE, Benedict WF. Cooperative effects of p53 and RB alterations in primary superficial bladder tumors. *Cancer Res* **57**:1217-1221, 1997b.

Cordon-Cardo C. Cell cycle regulators as prognostic factors for bladder cancer. *Eur Oncol* **33**(supl 4):11-12, 1998.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Pathologic Basis of Disease. 4^a ed., W. B. Saunders, pp:276-273, 1090-1094, 1989.

Cotran RS, Kumar V, Collins T: Robbins Pathologic Basis of Disease. 6^a ed., W. B. Saunders, pp:276-273, 1003-1008, 1999.

DeCresce R. The CAS 100: a computerised microscope image analysis system. *Lab Med* 17:163-165, 1986.

de Oliveira ML: Efeito de Baixas Doses de Samambaia *Pteridium aquilinum* sobre a Carcinogênese Induzida por N-butil-N-(4-hidroxitil)-nitrosamina e Uracil na Bexiga Urinária do Rato. Dissertação para a Obtenção do Grau de Mestre. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, pp:1-46, 1993.

Doll R: Epidemiology of human neoplasia. Oxford Textbook of Pathology. McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (Ed.), vol 1, University Press, pp:688, 1992.

Domagala W, Lasota J, Bartkowiak J, Weber K, Osborn M. Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am J Pathol* 136:219-227, 1990.

Decaestecker C, van Velthoven R, Petein M, Janssen T, Salmon I, Pasteels JL, van Ham Schulman C, Kiss R. The use of the decision tree technique and image cytometry to characterise aggressiveness in World Health Organization (WHO) grade II superficial transitional cell carcinomas of the bladder. *J Pathol* 178:274-283, 1996.

De Vita R, Forte D, Maggi F, Eleuteri P, Di Silverio F. Cellular DNA content and proliferative activity evaluated by Flow Cytometry versus histopathological and staging classifications in human bladder tumors. *Eur Urol* 19:65-73, 1991.

Durão JFC, Ferreira ML, Cabral M, Peleteiro MC, Afonso F, Correia J. Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. *Rev Port Ciências Vet* XC:132-137, 1995.

Elangbam CS, Qualls CW, Dahlgren RR. Cell Adhesion molecules – Update. *Vet Pathol* 34:61-73, 1997.

Epstein JI, Amin MB, Reuter VR, Mostofi FK, and the Bladder Consensus Conference Committee. The World Health Organization / International Society of Urological Pathology Consensus classification of urothelial (transitional cell) neoplasms of the urinary bladder. *Am J Surg Pathol* 22:1435-1448, 1998.

Farsund T, Hoestmark JG, Laerum OD. Relation between flow cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer. A report on 69 cases. *Cancer* 54:1771-1777, 1984.

Ferreira MVP, Ferreira VA, Schmitt FC. Análisis de DNA por citometria estática en carcinomas de mama. Parámetros de ploidia relacionados com factores pronósticos clásicos, receptores de estrógeno y p53. *Patologia* 35:49-58, 1997.

Fontana D, Bellina M, Gubetta L, Fasolis G, Rolle L, Scoffone C, Porpiglia F, Colombo M, Tarabuzzi R, Leonardo E. Monoclonal antibody Ki-67 in the study of proliferative activity of bladder carcinoma. *J Urol* **148**:1149-1151, 1992.

Fradet Y. Markers of prognosis in superficial bladder cancer. *Semin Urol* **10**:28-38, 1992.

Fradet Y, Cordon-Cardo C. Critical appraisal of tumor markers in bladder cancer. *Semin Urol* **21**:145-153, 1993.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H-D. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear Antigen that is defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* **138**:867-873, 1991.

Gerenutti M, Spinosa HS, Bernardi MM: Effects of bracken fern (*Pteridium aquilinum* L. Kuhn) feeding during the development of female rats and their offspring. *Vet Hum Toxicol* **34**: 49, 1992.

Gimeno EJ, Idiart JR, Massone AR, Nakayama H. Double immunoenzymatic labeling of intermediate filaments in bovine urinary bladder tumours. *J Comp Pathol* **111**:15-20, 1994.

Griffiths D: Urinary outflow tract. Oxford Textbook of Pathology. McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA (Ed.), vol 2a, University Press, pp:1521-1531, 1992.

Griffiths TRL, Mellon JK, Pyle GA, Shenton BK, Neal DE. P53 and ploidy assessed by flow cytometry in bladder washings. *Br J Urol* **76**:575-579, 1995.

Griffiths TRL, Brotherick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CHW, Shenton BK, Neal DE, Mellon JK. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* **74**:579-584, 1996.

Grignon DJ: Neoplasms of the urinary bladder. Urologic Surgical Pathology. Bostwick DG, Eble JN (Ed.), Mosby, pp:217-227, 1997.

Goulandris N, Karakitsos P, Georgoulakis J, Bellos CH, Deliveliotis CH, Legaki S. Deoxyribonucleic acid measurements in Transitional Cell Carcinomas: Comparison of Flow and Image Cytometry techniques. *J Urol* **156**:958-960, 1996.

Heyderman E, Me Brown B, Richardson TC. Epithelial markers in prostatic, bladder, and colorectal cancer: an immunoperoxidase study of epithelial membrane antigen, and prostatic acid phosphatase. *J Clin Pathol* **37**:1363-1369, 1984.

Hirono I, Yamada K, Niwa H, Shizuri Y, Ojika M, Hosaka S, Yamagi T, Wakamatsu K, Kigoshi H, Niiyama K, Uosaki Y: Separation of carcinogenic fraction of bracken fern. *Cancer Lett* **21**:239-246, 1984.

Hirono I: Carcinogenicity of Bracken fern and its causal principle. *Proceedings of the International Conference Bracken 89*, Sidney, 1989.

Hong RL, Pu YS, Hsieh, T-S, Chu JS, Lee WJ. Expression of E-cadherine and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol* **153**: 2025-2028, 1995.

Hug EB, Donnelly SM, Shipley WU, Heney NM, Kaufman DS, Preffer FI, Schwartz SM, Colvin RB, Althausen AF. Deoxyribonucleic acid flow cytometry in invasive bladder carcinoma: a possible predictor for successful bladder preservation following transurethral surgery and chemotherapy-radiotherapy. *J Urol* **148**:47-51, 1992.

Ioakim-Liossi AG, Karakitsos PJ, Pantazopoulos D, Aroni KG, Athanossiadon P. Image Cytometric analysis and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in transitional cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* **23**:401-407, 1999.

Jankowski JA, Bruton R, Shepherd N, Sanders DSA. Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. *J Clin Pathol Mol Pathol* **50**:289-290, 1997.

Jakse G, Rauschmeier H, Rosmanith P, Hofstädter F. Determination of Carcinoembryonic antigen in tissue, serum and urine in patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Urol Int* **38**:121-125, 1983.

Jautzke G, Altenaehr E. Immunohistochemical demonstration of Carcinoembryonic Antigen (CEA) and its correlation with grading and staging on tissue sections of urinary bladder carcinomas. *Cancer* **50**:2052-2056, 1982.

Jean-Blain C. Fougère aigle. *Le point Veterinaire* **29**(n. spécial "Toxicologie des ruminants"), 1998.

Jeffers MD, Paxton J, Bolger B, Richmond JA, Kennedy JH, McNicol AM. E-Cadherin and Integrin cell adhesion molecule expression in invasive and in situ carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* **64**:481-486, 1997.

Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg* **83**:437-446, 1996.

Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM. Transitional Cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? *Cancer* **60**:2766-2774, 1987.

Kim HS, Lee BL, Bae SI, Kim YI, Parks J-G, Kleinman HK, Kim WH. Differentiation of a colon cancer cell line on a reconstituted basement membrane *in vitro*. *Int J Exp Path* **79**:443-451, 1998.

Koss LG, Wersto RP, Simmons DA, Deitch D, Herz F, Freed SZ. Predictive value of DNA measurements in bladder washings. Comparison of Flow Cytometry, Image Cytometry, and Cytology in patients with a past history of urothelial tumors. *Cancer* **64**:916-924, 1989.

- Koss LG, Czerniak B. Image analysis and Flow Cytometry of tumors of prostate and bladder, with a comment on Molecular Biology of urothelial tumors. Pathology and pathobiology of the urinary bladder and prostate. Williams & Wilkinson, pp:112-128, 1992.
- Krügger S, Müller H. Correlation of morphometry, Nucleolar Organizer Regions, Proliferating Cell Nuclear Antigen and Ki-67 antigen expression with grading and staging in urinary bladder carcinomas. *Br J Urol* **75**:480-484, 1995.
- Lajoir G, Zbieranowsky I, Demianiuk C, Knappe WA, Edinger MG, Tubbs RR, Murray D. A Comparative study of DNA quantitation in breast carcinoma with image cytometric analysis and *in vitro* fine-needle aspiration with flow cytometric analysis. *Anatomic Pathology* **100**:456-462, 1993.
- Lal-Krishna, Dawara RK: Bracken fern induced carcinoma in Guinea pigs. *Ind J Vet Path* **18**: 21-26, 1994.
- LaRue H, Parent-Vaugois C, Bergeron A, Champetier S, Fradet Y. Influence of spatial configuration on the expression of carcinoembryonic antigen and mucin antigens in human bladder cancer. *Int J Cancer* **71**:986-992, 1997.
- Lee S, Tolmachoff T, Marchevsky AM. DNA content analysis ("Ploidy") by Image Analysis. Applications and comparison with Flow Cytometry. Image Analysis: A Primer for Pathologists. Marchevsky AM e Bartels PH (Ed). Raven Press, Ltd, pp: 261-307, 1994.
- Leers MPG, Theunissen PHMH, Ramaekers FCS, Schutte B. Multi-parameter flow cytometric analysis with detection of the Ki67-Ag in paraffin embedded mammary carcinomas. *Cytometry* **27**:283-289, 1997.
- Lianes P, Charytonowicz E, Cordon-Cardo C, Fradet Y, Grossman HB, Hemstreet GP, Waldman FM, Chew K, Wheelless LL, Faraggi D, and the National Cancer Institute Bladder Tumor Marker Network. *Clin Cancer Res* **4**:1267-1271, 1998.
- Limas C. Proliferative state of the urothelium with benign and atypical changes. Correlation with transferrin and Epidermal growth factor receptors and blood group antigens. *J Pathol* **171**:39-47, 1993.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ, Kiviranta J, Pesonen E. Prognosis of transitional cell bladder cancer: a multivariate prognostic score for improved prediction. *J Urol* **146**:1535-1540, 1991.
- Lipponen P, Saarelainen E, Ji H, Aaltomaa S, Syrjänen K. Expression of E-Cadherin (E-CD) as related to prognostic factors related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *J Pathol* **174**:101-109, 1994.
- Lyons SK, Clarke AR. Apoptosis and carcinogenesis. *Br Medical Bull* **52**:554-569, 1997.

Maltoni C, Selikoff IJ: Preface. Living in a Chemical World - Occupational and Environmental Significance of Industrial Carcinogens. Maltoni C, Selikoff IJ (Ed.), Annals of the New York Academy of Sciences, vol 534, Editorial Staff, 1988.

Masters JRW, Camplejohn RS, Constance Parkinson M, Woodhouse CRJ. DNA ploidy and the prognosis of stage pT1 bladder cancer. *Br J Urol* **64**:403-408, 1989.

Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I. E-Cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Res* **53**:1690-1695, 1993.

McCormick D, Yu C, Hobbs C, Hall PA. The relevance of antibody concentration to the immunohistological quantification of cell proliferation-associated antigens. *Histopathology* **22**: 543-547, 1993.

Mellon K, Neal D E, Robinson MC, Marsh C, Wright C. Cell cycling in bladder carcinoma determined by monoclonal antibody Ki67. *Br J Urol* **66**:281-285, 1990.

Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol* **5**:1690-1703, 1987.

Mialhe A, Louis J, Montlevier S, Peoch M, Pasquier D, Bosson JL, Rambeaud JJ, Seigneurin D. Expression of E-cadherin and alfa-, beta- and gamma-cadherins in bladder carcinomas: are they good prognostic factors? *Invasion Metastasis* **17**:124-137, 1997.

Miao T, Wang Z, Sang N, Xiong R, Cao S. Clinical significance of flow cytometric deoxyribonucleic acid measurements of deparafinized specimens in bladder tumors. *Eur Urol* **21**:98-102, 1992.

Moreno Sierra M, Chicharro Allmarza GJ, Torronteras Santiago JM, Ortega Heredia MD, Maestro de las Casas ML, Silmi Moyano A, Resel Estevez L. Advances regarding tumor markers in bladder cancer. *Actas Urol Esp* **21**:195-205, 1997.

Morton RA, Ewing CM, Nagafuchi A, Tsukita S, Isaacs WB. Reduction of E-cadherin levels and deletion of the K-Cadherin gene in human prostate cancer cells. *Cancer Res* **53**:3585-3590, 1993.

Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA. WHO Histological typing of urinary bladder tumours. Springer, 2ª ed, 1999.

Mulder AH, Van Hootegem JCSP, Sylvester R, Ten Kate FJW, Kurth KH, Ooms ECM, van der Kwast ThH. Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expression of a cell cycle-related nuclear antigen (Ki-67). *J Pathol* **166**:37-43, 1992.

Murphy WM: Urothelial neoplasia. Pathology and Pathobiology of the Urinary Bladder and Prostate. Weinstein RS, Gardner WA (Ed.), International Academy of Pathology Monographs, Williams & Wilkins, pp:77-111, 1992.

Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM: Tumors of the Urinary Bladder. Atlas of Tumor Pathology - Tumors of the Kidney, Bladder and Related Structures. Murphy WM, Beckwith JB, Farrow GM (Ed.), AFIP, pp:198-201, 1996.

Murphy WM. Diseases of the urinary bladder, urethra, ureters and renal pelvis. Urological Pathology, 2ª Ed, Murphy WM.(ed). Saunders, pp:64-106, 1997.

Nakanishi K, Kawai T, Torikata C, Aurues T, Ikeda T. E-cadherin expression in upper-urinary-tract carcinoma. *Int J Cancer* **74**:446-449, 1997.

Nenning H, Raßler J, Minh DH, Atolsenburg J-U. The value of DNA cytometry in Transitional Cell Carcinoma of the Urinary Bladder. *Gen Diagn Pathol* **143**:231-236, 1997.

Ngomuo AJ, Jones RS: Citotoxicity studies of quercetin, shikimate, cyclohexanecarboxylate and ptaquiloside. *Vet Hum Toxicol* **38**:14-18, 1996a.

Ngomuo AJ, Jones RS: Genotoxicity studies of quercetin and shikimate *in vivo* in the bone marrow of mice and gastric mucosal cell of rats. *Vet Hum Toxicol* **38**:176-180, 1996b.

Norming U, Nyman CR, Tribukait B. Comparative Flow Cytometric deoxyribonucleic acid studies on exophytic tumor and random mucosal biopsies in untreated carcinoma of the bladder. *J Urol* **142**:1442-1447, 1989.

Norming U, Tribukait B, Gustafson H, Nyman CR, Wang N, Wijkström H. Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder: a study of 63 patients with Grade 3 lesions. *J Urol* **147**:11-15, 1992a.

Norming U, Tribukait B, Nyman CR, Nillson B, Wang N. Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 Grade 3 carcinoma of the bladder. *J Urol* **148**:1420-1427, 1992b.

Okamura K, Miyake K, Koshikawa T, Asai J. Growth fractions of transitional cell carcinomas of the bladder defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Urol* **144**:875-878, 1990.

Ordóñez NG, Rosai J: Urinary tract. Ackerman's Surgical Pathology. Rosai J (Ed.), 8ª ed., Mosby, pp:1193-1208, 1996.

Ordóñez NG. Value of trombomodulin immunostaining in the diagnosis of transitional cell carcinoma: a comparative study with carcinoembryonic antigen. *Histopathology* **31**:517-524, 1997.

Orntoft TF, Wolf H. Molecular alterations in bladder cancer. *Urol Res* **26**:223-233, 1998.

Otto T, Birchmeier W, Schmidt U, Hinke A, Schipper J, Rubben H, Raz A. Inverse relation of E-cadherin and Autocrine Motility Factor receptor expression as a prognostic factor in patients with bladder carcinoma. *Cancer Res* **54**:3120-3123, 1994.

- Otto T, Bex A, Schmidt U, Raz A, Rubben H. Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. *Am J Pathol* **150**:1919-1923, 1997.
- Özkul IA, Aydin Y. Tumours of the urinary bladder in cattle and water buffalo in the Black Sea region of Turkey. *Br Vet J* **152**:473-475, 1996.
- Pamukcu AM, Ertürk E, Yalçiner S, Bryan GT: Histogenesis of urinary bladder cancer induced in rats by bracken fern. *Invest Urol* **4**: 213-218, 1976.
- Pamukcu AM, Erturk E, Yalciner S, Milli U, Bryan GT: Carcinogenic and mutagenic activities of milk from cows fed bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res* **38**: 1556-1560, 1978.
- Pamukcu AM, Yalciner S, Hatcher JF, Bryan GT: Quercetin, a rat intestinal and bladder carcinogen present in bracken fern (*Pteridium aquilinum*). *Cancer Res* **40**: 3468-3472, 1980.
- Paul R, Ewing CM, Jarrard DF, Isaacs WB. The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. *Br J Urol* **79**:37-43, 1997.
- Pauwels RPE, Schapers RFM, Smeets AWGB, Debruyne FMJ, Geraedts JPM. Grading in Superficial bladder cancer. (1) Morphological criteria. *Br J Urol* **61**:129-134, 1988.
- Petersen RO: The urinary tract and male reproductive system. Pathology. Rubin E, Farber JB (Ed.), 2^a ed., J B Lippincott Co, pp:877-881, 1994.
- Phillips BS. Bladder tumors in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education* **21**:540-546, 1999.
- Pignatelli M. E-cadherin: a biological marker of tumour differentiation. *J Pathol* **171**:81-82, 1993.
- Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Klöppel G, Lemoine NR. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade, and advanced stage. *J Pathol* **174**:243-248, 1994.
- Prakash AS, Pereira TN, Smith BL, Shaw G, Seawright AA: Mechanism of bracken fern carcinogenesis: evidence for H-ras activation via initial adenine alkylation by ptaquiloside. *Nat Toxins* **4**:221-227, 1996.
- Presti Jr CJ, Reuter VE, Galan T, Fair WR, Cordon-Cardo C. Molecular genetic alterations in superficial and locally advanced human bladder cancer. *Cancer Res* **51**:5405-5409, 1991.
- Pycha A, Mian C, Hofbauer J, Brossner C, Haitel A, Wiener H, Marberger M. Multifocality of Transitional Cell carcinoma results from genetic instability of entire transitional epithelium. *Urol* **53**:92-97, 1999.

Raitanen MP, Tammela TLJ, Kallioinen M, Isola J. P53 accumulation, Deoxyribonucleic acid ploidy and progression of bladder cancer. *J Urol* **157**:1250-1253, 1997.

Rao JY, Hemstreet III GP, Hurst RE, Bonner RB, Jones PL, Min KW, Fradet Y. Alterations in phenotypic biochemical markers in bladder epithelium during tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8287-8291, 1993.

Rebel JMJ, Thijssen CDEM, Vermey M, Delouvé A, Zwarthoff EC, Van der Kwast TH. E-cadherin expression determines the mode of replacement of normal urothelium by human bladder carcinoma cells. *Cancer Res* **54**:5488-5492, 1994.

Reeder JE, Cox C, Wheelless LL, Flint A, Liebert M, Grossman HB, and the Bladder Tumor Marker Network. *Cytometry* **28**:176-180, 1997.

Reznikoff CA, Belair CD, Yeager TR, Savelieva E, Blesloch RH, Puthenveetil JA, Cuthill S. A molecular genetic model of human bladder cancer pathogenesis. *Sem Oncol* **23**:571-584, 1996.

Richmond PJM, Karayiannakis AJ, Nagafuchi A, Kaisary AV, Pignatelli M. Aberrant E-cadherin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res* **57**:3189-3193, 1997.

Roels S, van Diest PJ, Beliën JAM, Ducatelle R. Computerized Image Analysis in diagnostic veterinary pathology – Is the era of descriptive veterinary pathology coming to an end? *Eur J Vet Pathol* **4**:21-27, 1998.

Ross JS, Del Rosário AD, Figge HL, Sheehan C, Fisher HAG, Bui HX. E-cadherin expression in papillary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol* **26**:940-944, 1995.

Rubin E, Farber JL: Environmental and nutritional pathology. Pathology. 2^a ed., J B Lippincott Co, pp:144-194, 290-291, 1994.

Sakai H, Toyofuku K, Yogi Y, Minami Y, Kanetake H, Saito Y. Carbohydrate antigen 19-9 and carcinoembryonic antigen-producing Transitional Cell Carcinoma of the ureter and bladder: a case report. *J Urol* **150**:182-184, 1993.

Sampedro A, Orfao A. DNA cytometric analysis. Serviço de Publicações da Universidade de Oviedo, 1993.

Sasaki K, Hamano K, Kinjo M, Hara S. Intratumoral heterogeneity in DNA ploidy of bladder carcinomas. *Oncology* **49**:219-222, 1992.

Schalken JA. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *Eur Urol* **33**:13-14, 1998.

Schapers RFM, Ploem-Zaaijer JJ, Pauwels RPE, Smeets AWGB, van der Brandt PA, Tanke HJ, Bosman FT. Image cytometric DNA analysis in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer* **72**:182-189, 1993.

Scher HI, Shipley WU, Herr HW: Cancer of the bladder. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (Ed.), 5^{ed.}, Lippincott-Raven, pp:1300-1301, 1997.

Schlter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad H-D, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123:513-522, 1993.

Schmitt F. Citometria estática de DNA. *Cytometry, Cytogenetics and Molecular Biology of Cancer Diagnosis and Prognosis. Parte 2. Practical sessions*, 1994.

Screaton RA, Penn LZ, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human marker, cooperates with Myc and Bcl-2 in cellular transformation. *J Cell Biol* 137:939-952, 1997.

Seawright AA: Directly toxic effects of plant chemicals which may occur in human and animal foods. *Nat Toxins* 3:227-232, 1995.

Shahin M, Moore MR, Smith BL, Seawright AA, Prakash AS. Acute and chronic toxicity induced by activated Ptaquiloside in rats: comparison of pathology due to oral and intravenous administration. 5th International Symposium on Poisonous Plants, Texas, 1997.

Shahin M, Smith BL, Worrall S, Moore MR, Seawright AA, Prakash AS. Bracken fern carcinogenesis: multiple intravenous doses of activated Ptaquiloside induce DNA adducts, monocytosis, increased TNFK levels, and mammary gland carcinoma in rats. *Biochemical and Biophysical Res communications* 244:192-197, 1998.

Shevchuk MM, Fenoglio CM, Richart RM. Carcinoembryonic Antigen Localization in Benign and Malignant transitional epithelium. *Cancer* 47:899-905, 1981.

Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CFJ, Akaza H, Koiso K, Debruyne FMJ, Bringuier PP. Prognostic value of Cadherin-associated molecules (K-, 2-, and 3-Catetins and p120^{cas}) in bladder cancer. *Cancer Res* 56:4154-4158, 1996.

Shiina H, Igawa M, Yagi H, Urakami S, Yoneda T, Shirakawa H, Ishibe T. Immunohistochemistry of p53 protein in transitional cell carcinoma of the bladder using an image analyzer. *Oncology* 53:233-240, 1996.

Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. *Cancer* 77:1605-1613, 1996.

Smith BL, Seawright AA: Bracken fern (*Pteridium* spp) carcinogenicity and human health – a brief review. *Nat Toxins* 3:1-5, 1995.

Smith MEF, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catetin complex. *Histopathology* 31:107-111, 1997.

Stavropoulos NE, Ioackim-Velogianni E, Hastazeris K, Kitsiou E, Stefanaki S, Agnantis N. Growth fractions in bladder cancer defined by Ki67: association with cancer grade, category and recurrence rate of superficial lesions. *Br J Urol* 72:736-739, 1993.

Stein JP, Grossfeld GD, Ginsberg DA, Esrig D, Freeman JÁ, Figueroa AJ, Skinner DG, Cote RJ. Prognostic markers in bladder cancer: a contemporary review of the literature. *J Urol* **160**:645-659, 1998.

Stöckle M, Steinbach F, Voges G, Hohenfellner R. Image analysis DNA Cytometry of bladder cancer. *Recent Results in Cancer Res*, vol 22 pp:151-163, Springer-Verlag Berlin, 1993.

Strickland PT, Kensler TW: Chemical and physical agents in our environment. *Clinical Oncology*. Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, Niederhuber JE (Ed.), Churchill Livingstone, pp:151-156, 1995.

Syrigos KN, Krausz T, Waxman J, Pandha H, Rowlinson-Busza G, Verne J, Epenetos AA, Pignatelli M. E-Cadherin expression in bladder cancer using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: correlation with histopathological grade, tumor stage and survival. *Int J Cancer (Pred Oncol)* **64**:367-370, 1995.

Tachibana M, Deguchi N, Jitsukawa S, Baba S, Hata M, Tazaki H. Quantification of cell kinetic characteristics using flow cytometric measurements of deoxyribonucleic acid and bromodeoxyuridine for bladder cancer. *J Urol* **145**:963-967, 1991.

Tachibana MD, Miyakawa A, Miyakawa M, Saito S, Nakamura K, Baba S, Murai M. Prognostic significance of flow cytometric deoxyribonucleic acid analysis for patients with superficial bladder cancer: A long term follow-up study. *Cancer Detect Prev* **23**:155-162, 1999.

Tailly G, Cornelissen M, Vereecken RL, Verduyn H, Devos P, de Roo M. Urinary carcinoembryogenic antigen (CEA) in the diagnosis and follow-up of bladder carcinoma. *Br J Urol* **55**:501-507, 1983.

Têtu B, Katz RL, Kalter SP, von Eschenbach AC, Barlogie B. Acridine-Orange Flow cytometry of urinary bladder washings for the detection of Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer* **60**:1815-1822, 1987.

Thomas DJ, Robinson MC, Charlton R, Wilkinson S, Shenton BK, Neal DE. P53 expression, ploidy and progression in pT1 transitional cell carcinoma of bladder. *Br J Urol* **73**:533-537, 1993.

Torenbeek R, Lagendijk JH, Van Diest PJ, Bril H, Van de Molengraft FJJM, Meijer CJLM. Value of a panel of antibodies to identify the primary origin of adenocarcinomas presenting as bladder carcinoma. *Histopathology* **32**:20-27, 1998.

Trichopoulos D, Li Fp, Hunter DJ: What causes cancer? *S American* **275**:50-57, 1996.

Trichopoulos D, Lipworth L, Petridou E, Adami H-O: Epidemiology of cancer. *Cancer Principles & Practice of Oncology*. DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA (Ed.), 5ªed., Lippincott-Raven, pp:231-249, 1997.

Tsuji M, Kojima K, Murakami Y, Kanayama H, Kagawa S. Prognostic value of Ki-67 antigen and p53 protein in urinary bladder cancer: immunohistochemical analysis of radical cystectomy specimens. *Br J Urol* **79**:367-372, 1997.

Tsujihashi H, Nakanishi A, Matsuda H, Uejima S, Kurita T. Cell proliferation of human bladder tumors determined by BRURD and Ki-67 immunostaining. *J Urol* **145**:846-849, 1991.

Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Oosterhof GON, Debruyne FMJ, Schalken JA. Decrease E-cadherine expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* **54**:3929-3933, 1994.

Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Xue Y, Debruyne FMJ, Schalken JA. Relation between aberrant K-Catetin expression and loss of E-cadherine function in prostate cancer. *Int J Cancer* **74**:374-377, 1997.

Van der Poel HG, Boon ME, van Stratum P, Ooms ACM, Wiener H, Debruyne FMJ, Witjes JA, Schalken JA, Murphy MD. Conventional bladder wash cytology performed by four experts versus quantitative Image analysis. *Mod Pathol* **10**:976-982, 1997.

van Leeuwen IS, Hellmen E, Cornelisse CJ, Van der Burgh B, Rutteman GR. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Res* **16**:3737-3744, 1996.

van Velthoven, Petein M, Oosterlinck WJ, Zandona C, Zlotta A, Van der Meijden, Pateels J-L, Roels H, Schulman C, Kiss R. Image Cytometry determination of ploidy level, proliferative activity, and nuclear size in a serie of 314 transitional bladder cell carcinomas. *Hum Pathol* **16**: 3-11, 18, 1995.

Veronese SM, Gambacorta M, Gottardi O, Scanzi F, Ferrari M, Lampertico P. Proliferation Index as a prognostic marker in Breast cancer. *Cancer* **71**:3927-3930, 1993.

Vet JAM, Debruyne FMJ, Schalken JA. Molecular prognostic factors in bladder cancer. *World J Urol* **12**:84-88, 1994.

Villalobos-Salazar J, Meneses J, Salas J: Carcinogenic effects in mice of milk from cows fed on Bracken fern *Pteridium aquilinum*. *Proceedings of the International Conference Bracken 89*, Sidney, 1989.

Vindeløv LL, Svend IJ, Engelholm AS, Gulddammer BH, Højgaard K, Sørensen BL, Wolf H. Prognostic significance of DNA content in bladder cancer based on flow cytometric analysis of 249 transitional cell carcinomas. *Cytometry* **22**:93-102, 1995.

Vleminckx K, Vakaet Jr L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic Manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* **66**:107-119, 1991.

Vogel J, Oehr P, Maisey R, Adolphs H-D. Comparison between tissue antigen analysis and plasma determinations for TPA and CEA in Transitional Cell Carcinomas and in tumorfree urothelium of the urinary bladder. *Cancer Detect Prev* **11**:389-396, 1988.

Wagner URS, Sauter G, Moch H, Novotna H, Epper R, Mihatsch MJ, Waldman FM. Patterns of p53, erbB-2, and EGF-r expression in malignant lesions of the urinary bladder. *Hum Pathol* **26**:970-978, 1995.

Weid GL, Bartels PH, Bibbo M, Dytch HE. Image analysis in quantitative cytopathology and histopathology. *Hum Pathol* **20**:549-570, 1989.

Wheless LL, Badalament RA, deVere White RW, Fradet Y, Tribukait B; Consensus review of the clinical utility of DNA Cytometry in bladder cancer. *Cytometry* **14**:478-481, 1993.

Wijkström H, Grandberg-Öhman I, Tribukait B. Chromosomal and DNA patterns in Transitional Cell Bladder Carcinoma. *Cancer* **53**:1718-1723, 1984.

Witjes J A, Umbas R, Debruyne FMJ, Schalken JÁ. Expression of markers for transitional cell carcinoma in normal bladder mucosa of patients with bladder cancer. *J Urol* **154**:2185-2189, 1995.

Wright C, Thomas D, Mellon K, Neal DE, Horne W. Expression of retinoblastoma gene product and p53 protein in bladder carcinoma: correlation with Ki67 index. *Br J Urol* **75**:173-179, 1995.

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Cell Tissue Res* **283**:191-201, 1996.

Witjes J A, Umbas R, Debruyne FMJ, Schalken JA. Expression of markers for transitional cell carcinoma in normal bladder mucosa of patients with bladder cancer. *J Urol* **154**:2185-2189, 1995

Wolf JC, Ginn PE, Homer B, Fox LE, Kurzman ID. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. *Vet Pathol* **34**:394-404, 1997.

Wrobel KH, Bickel D, Kujat R. Immunohistochemical study of seminiferous epithelium in adult bovine testis using monoclonal antibodies against Ki-67 protein and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA). *Cell Tissue Res* **283**:191-201, 1996.

Young RH, Eble JN: Tumours of the urinary tract. Diagnostic Histopathology of Tumors. Fletcher CDM (Ed.), vol 1, Churchill Livingstone, pp:372-390, 1996.

ESTUDOS FUTUROS

ESTUDOS FUTUROS

Os resultados do trabalho por nós desenvolvido despertaram-nos o interesse para a continuação da realização de estudos nas neoplasias uroteliais vesicais. Assim, achamos pertinente realizar:

- O estudo das diferenças entre os carcinomas de padrão bifásico e os transicionais; análise da importância das áreas de tipo adenocarcinoma e da sua associação com o comportamento biológico das neoplasias. Tal estudo implicará o alargamento da presente série de carcinomas vesicais.

- O estudo das moléculas de adesão, nomeadamente das catetinas alfa, beta e gama, e integrinas; estudos mais aprofundados sobre a importância da caderina E e CD44 na tumorigénese das neoplasias bovinas, por técnicas de biologia molecular.

- A análise das alterações génicas associadas ao processo de cancerização vesical, em particular dos genes TP53, ras, c-erbB-2, Bcl2 por técnicas de PCR, SSCP e sequenciação de genes.

- O estudo da instabilidade das sequências de microssatélites das lesões neoplásicas e pré-neoplásicas.

- Estudos sobre a importância do Papilomavírus Bovino tipo 2 (PVB-2) na etiologia das neoplasias uroteliais.

- Estudos ultraestruturais nos vários tipos histológicos de neoplasias do urotélio bovino observados

- Realização de um modelo experimental, com estudo da morfologia, ploidia de ADN e ultraestrutura das lesões vesicais induzidas em animais de laboratório alimentados com o feto *P aquilinum*.