

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

PAULA MAYUMI ONO

**CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P53, E-CADERINA E
METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CÃES**

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2010

PAULA MAYUMI ONO

**CARACTERIZAÇÃO DOS PARÂMETROS MORFOLÓGICOS E
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P53, E-CADERINA E
METALOPROTEINASES -2 E -9 EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DE CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Patologia Animal e Comparada.

Orientador: Prof^a Dr^a Cristina Santos Sotomaior

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2010

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado
é alguém que acredite que ele possa ser
realizado.”*

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

A Deus, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele.

Aos meus pais e irmãos e a toda minha família que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até a esta etapa de minha vida. A eles, o meu amor, respeito e dedicação e admiração sempre.

A professora e orientadora, Prof^a. Dr^a Cristina Santos Sotomaior, por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a conclusão desta dissertação.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, em nome da Prof^a Dr^a Lúcia de Noronha e das funcionárias Marina e Ana Paula, pelas inúmeras tentativas com a imunistoquímica e que ao final tudo deu certo.

A secretária do Mestrado em Ciência Animal, Denise do Rocio Candido, pelo apoio, pelo convívio, pela amizade cultivada nestes intensos dois anos de curso.

A todos os meus amigos, pelo apoio e incentivo de nunca desistir e por sua eterna amizade e dedicação.

Ao meu anjinho de quatro patas, Sushi, por estar sempre ao meu lado me fazendo companhia, seja na alegria ou na tristeza e em todos os momentos desta conquista.

E por fim gostaria de agradecer todos que de alguma maneira me ajudaram a concretizar este trabalho, e dizer que durante este trabalho as dificuldades não foram poucas, os desafios foram muitos, e muitas vezes a vontade de desistir surgiu, porém, a garra e a tenacidade foram mais fortes, sobrepondo esse sentimento, fazendo-me seguir a caminhada, apesar da sinuosidade do caminho. Agora ao olhar para trás, a sensação do dever cumprido se faz presente e podemos constatar que as noites de sono perdidas, os longos tempos de leitura, digitação, discussão; a ansiedade em querer fazer e a angústia de muitas vezes não o conseguir, por problemas estruturais; não foram em vão. Como dizia *Antoine Saint Exupéry* em sua obra prima *“O Pequeno Príncipe”*: **“Foi o tempo que perdeste com a tua rosa, que fez a tua rosa tão importante.”**

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPITULO 1 – DIAGNÓSTICO E MARCADORES TUMORAIS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES – REVISÃO	10
RESUMO	11
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 ETIOLOGIA	12
3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	14
4 DIAGNÓSTICO	16
4.1 CITOLOGIA.....	16
4.2 HISTOPATOLOGIA.....	17
4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	20
5 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO	21
6 MARCADORES TUMORAIS	22
6.1 MARCADORES MOLECULARES DO CICLO CELULAR.....	23
6.1.1 Ciclo celular	23
6.1.2 Proteínas reguladoras do ciclo celular	24
6.1.2.1 Gene Supressor de Tumor p53 (TP53)	25
6.2 E-CADERINA.....	29
6.3 METALOPROTEINASES.....	31
6.3.1 Gelatinases (MMP-2 e MMP-9)	37

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
CAPITULO 2 – CARACTERIZAÇÃO DOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P53, E-CADERINA E METALOPROTEINASES 2 E 9 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CÃES.....	55
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	57
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 AMOSTRAS E SELEÇÃO.....	62
2.2 HISTOLOGIA.....	62
2.2.1 Processamento e avaliação histológica.....	62
2.3 IMUNOISTOQUÍMICA.....	63
2.3.1 Processamento das amostras para a imunoistoquímica.....	63
2.3.2 Anticorpos.....	64
2.3.3 Análise quantitativa da expressão da p53, e-caderina e MMP-2 e -9.....	64
3 RESULTADOS.....	66
3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	66
3.2 IDADE.....	66
3.3 RAÇAS E SEXO.....	67
3.4 LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA.....	68
3.5 HISTOPATOLOGIA.....	68
3.6 IMUNOISTOQUÍMICA.....	76
3.6.1 Análise imunoistoquímica da p53.....	76
3.6.2 Análise imunoistoquímica da e-caderina.....	78

3.6.3	Análise imunoistoquímica das MMP-2 e -9.....	80
4	DISCUSSÃO.....	86
5	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	94

RESUMO

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) ou carcinomas epidermóides são neoplasias malignas de células epiteliais comuns em todas as espécies. Ocorre principalmente em áreas mais despigmentadas da pele, sendo que a exposição crônica à radiação ultravioleta é um dos fatores importantes para o desenvolvimento do tumor. Com o objetivo de caracterizar os parâmetros morfológicos, determinar o grau de malignidade e avaliar a expressão da p53, e-caderina e metaloproteinases (MMP) -2 e -9 em carcinoma de células escamosas de cães, foi realizado um estudo retrospectivo. O material foi obtido nos arquivos do Laboratório de Patologia Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, no período de 1996 a 2009, totalizando 3686 registros de neoplasias. De 63 casos de CCE em animais domésticos, foram selecionadas 13 amostras de CCE em cães. Os parâmetros morfológicos analisados foram: pleomorfismo nuclear e celular, número de mitoses, presença de pérolas de queratina, pontes intercelulares, cordões ou fileiras, população densa de células neoplásicas, estroma, metaplasia, estágio de invasão e tipo de infiltrado inflamatório. Dados como idade, raça, sexo e localização corpórea foram analisados e descritos. Dos 13 tumores, 38,5% foram classificados como bem diferenciados, 38,5% como moderadamente diferenciados e 11% como pouco diferenciados. O principal parâmetro utilizado para caracterizar o CCE foi o pleomorfismo celular e nuclear, que se manteve consistente com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), divergindo somente em 7,7% das amostras. Outros parâmetros como número de mitoses, pérolas de queratina e pontes intercelulares apresentaram divergências em 23 a 46% das amostras analisadas. As divergências encontradas podem indicar a necessidade de análises mais precisas destes parâmetros morfológicos para a classificação de CCE em cães. Das sete amostras analisadas pela imunohistoquímica, em nenhuma foi observada a expressão das proteínas p53 e e-caderina. Já em relação às MMP-2 e -9, quatro amostras apresentaram imunexpressão para ambas as metaloproteinases e em três amostras foi observada a ausência da expressão. As MMP-2 e -9 parecem apresentar um papel importante no comportamento agressivo no carcinoma de células escamosas e o emprego destes marcadores na rotina da histopatologia veterinária poderia servir como indicador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas em cães.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas. Histologia. Imunohistoquímica. MMP-2. MMP-9

ABSTRACT

Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a malignant tumor of epithelial cells common to all species. It occurs mainly in areas of less pigmented skin, whereas chronic exposure to ultraviolet radiation is an important factor for tumor development. Aiming to characterize the morphological parameters, determine the degree of malignancy and to evaluate the expression of p53, E-cadherin and matrix metalloproteinases (MMP) -2 and -9 in squamous cell carcinoma of dogs, we performed a retrospective study. The material was collected in the archives of the Laboratory of Animal Pathology at the Catholic University of Parana, in the period 1996 to 2009, total of 3686 records neoplasms. Of 63 cases of CCE in domestic animals, 13 samples were selected for CCE in dogs. The morphological parameters analyzed were nuclear and cellular pleomorphism, number of mitoses, presence of keratin pearls, intercellular bridges, strings or rows, dense population of neoplastic cells, stromal metaplasia, stage of invasion and type of inflammatory infiltrate. Data such as age, race, sex and body location were analyzed and described. Of the 13 tumors, 38.5% were classified as well differentiated, 38.5% moderately differentiated and 11% as poorly differentiated. The main parameter used to characterize the CCE was the cellular and nuclear pleomorphism, which remained consistent with the classification of the World Health Organization (WHO), differing only in 7.7% of samples. Other parameters such as number of mitoses, keratin pearls and intercellular bridges were differences in 23-46% of the samples. These divergences may indicate the need for more accurate analysis of morphological parameters for the classification of CCE in dogs. Of the seven samples analyzed by immunohistochemistry, any expression of p53 and E-cadherin was observed. With regard to MMP-2 and -9, four samples showed immunoreactivity for both MMPs and three samples lack of expression were observed. The MMP-2 and -9 appear to play an important role in aggressive behavior in squamous cell carcinoma and the use of these markers in routine veterinary histopathology could serve as a prognostic indicator for squamous cell carcinoma in dogs.

Key-words: Squamous Cell Carcinoma. Histology. Immunohistochemistry. MMP-2. MMP-9

CAPÍTULO 1
DIAGNÓSTICO E MARCADORES TUMORAIS EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS EM CÃES – Revisão
(Diagnosis and Tumor Markers in Squamous Cell Carcinoma in dogs – Review)

CAPÍTULO 1 - DIAGNÓSTICO E MARCADORES TUMORAIS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES – Revisão

(Diagnosis and Tumor Markers in Squamous Cell Carcinoma in dogs – Review)

Paula Mayumi Ono¹ Cristina Santos Sotomaior²

¹ Mestranda em Ciência Animal – PUCPR, médica veterinária;
paulinha_ono@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, PUCPR, cristina.sotomaior@pucpr.br

RESUMO

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna dos queratinócitos. O desenvolvimento desse tipo de tumor está associado a muitos fatores, incluindo a exposição prolongada à luz ultravioleta, falta de pigmento na epiderme, perda de pêlos ou cobertura pilosa muito esparsa nos locais afetados. Esta revisão tem por objetivo discutir sobre as principais características clínicas desta neoplasia, o diagnóstico, as alternativas de tratamento do carcinoma de células escamosas em cães e o prognóstico. Será discutido ainda a importância da imunohistoquímica no diagnóstico de neoplasias na medicina veterinária, assim como descrever os principais marcadores biológicos que são utilizados no diagnóstico de CCE.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Cães. Diagnóstico. Imunohistoquímica. Oncologia.

ABSTRACT

Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a malignant neoplasm of keratinocytes. The development of this tumor type is associated with many factors, including prolonged exposure to ultraviolet light, lack of pigment in the epidermis, loss of hair or fur coat very sparse in affected sites. This review aims to discuss the main clinical characteristics of this tumor, the diagnosis, treatment options in squamous cell carcinoma in dogs and prognosis. It also proposes to discuss the importance of immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms in veterinary medicine and describe the main biologic markers that will be used in the diagnostic of CCE.

Key-words: Squamous Cell Carcinoma. Dogs. Diagnostic. Immunohistochemistry. Oncology.

1 INTRODUÇÃO

A incidência das neoplasias nos animais domésticos vem crescendo consideravelmente, sendo atualmente a principal causa de morte entre os cães. Essa incidência tem sido atribuída à maior longevidade observada nestes animais e também por uma maior convivência destes com o homem. As neoplasias cutâneas e subcutâneas são as mais comuns em cães, representando aproximadamente um terço dos tumores que ocorrem na espécie, sendo que o Carcinoma de Células Escamosas (CCE) corresponde a 5% desses tumores (WITHROW; MACEWEN, 2007).

O CCE é um tumor maligno dos queratinócitos, também conhecido por carcinoma espinocelular, carcinoma de células espinhosas ou carcinoma epidermóide. Esta neoplasia é comum em bovinos, eqüinos, felinos e caninos, relativamente incomum em ovinos e raro em caprinos e suínos (FERNANDES, 2001). Pode ocorrer em animais jovens, mas a incidência aumenta com a idade (FERNANDES, 2001; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Esse tipo de neoplasia, que é a forma mais evidente de carcinoma da pele, deriva do epitélio escamoso estratificado. O epitélio neoplásico pode, ou não, cornificar, dependendo da natureza do epitélio do qual se origina (JONES *et al.*, 2000).

O objetivo desta revisão de literatura foi discorrer sobre a etiologia, as principais características clínicas desta neoplasia, o diagnóstico, as alternativas de tratamento do CCE em cães e o prognóstico. Será discutido ainda a importância da imunistoquímica no diagnóstico desta neoplasia, assim como os principais marcadores biológicos que são utilizados no diagnóstico do CCE em cães.

2 ETIOLOGIA

As neoplasias cutâneas desenvolvem-se secundariamente a mudanças moleculares básicas. A transformação em células neoplásicas é o resultado final de uma série de eventos que causam danos ao DNA: radiação solar, Raios-X, infecções virais e traumas contínuos. Estes são importantes contribuintes para transformação neoplásica dos componentes da pele. Quatro categorias de genes são responsáveis pela maioria da produção das proteínas reguladoras da proliferação e diferenciação celular. Estas categorias são: genes de supressão

tumoral, protooncogenes, genes que regulam a apoptose e genes que regulam o reparo do DNA. A expressão anormal devido aos danos causados nestes genes levam a um desarranjo na proliferação celular ou na função das proteínas, como os fatores de crescimento, receptores do fator de crescimento, proteínas sinalizadoras da tradução, regulação do ciclo celular e fatores de transcrição nuclear. A maioria das neoplasias malignas tem danos evidentes ou mutações de múltiplos genes dentro destas categorias. Essas mudanças moleculares são correlacionadas ao comportamento clínico de algumas neoplasias. Por exemplo, sabe-se que no CCE, freqüentemente, desenvolvem-se uma série de estágios progressivos: hiperplasia epidermal, displasia, carcinoma *in situ* e, por fim o carcinoma propriamente dito de forma invasiva (HARGIS; GINN, 2007).

A progressão da doença de uma simples hiperplasia para um carcinoma invasivo representa uma série de eventos moleculares, onde uma população de células ancora um aumento em número de genes danificados, que pertencem às quatro categorias listadas. Esta série de mudanças demora em acontecer e pode levar vários anos antes que o tumor alcance seu máximo potencial maligno. O processo pode ser interrompido nos estágios iniciais se os agentes causadores são removidos, como por exemplo, exposição aos raios UV (HARGIS; GINN, 2007).

Embora a etiologia não seja bem conhecida, existem muitos fatores relacionados ao ambiente e ao hospedeiro que estão associados ao desenvolvimento do CCE. Acredita-se que a exposição prolongada à luz ultravioleta seja um dos principais fatores, sendo a radiação ultravioleta B a mais oncogênica e imunossupressora (HARGIS *et al.*, 1977; KWA *et al.*, 1992). Outros fatores também podem estar envolvidos na etiologia do CCE, como a falta de pigmento na epiderme, perda de pêlos ou cobertura pilosa muito esparsa nos locais afetados (GOLDSCHIMIDT; HENDRICK, 2002; RAMOS *et al.*, 2004; HARVEY; MCKEEVER, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006).

A radiação solar ultravioleta atua como agente carcinogênico na formação de câncer cutâneo, provocando reações fotoquímicas que ativam as vias inflamatórias, alteram o sistema imune e lesam diretamente o DNA. Essa combinação de eventos resulta em um reparo inadequado dos fotoprodutos do DNA, gerando mutações permanentes nos genes reguladores e expansão por clonagem de células pré-malignas. Sob o ponto de vista histológico, as lesões progridem de hiperplasia epidérmica pré-neoplásica com displasia para ceratose actínica e, por sua vez, para

carcinoma de células escamosas (KRAEGEL; MADEWELL, 2004). A lesão pela radiação ultravioleta é acumulativa e dependente da dose, sendo determinada pela densidade do pêlo, pela coloração da pele, pelo tempo de exposição à luz solar, pela localização geográfica e pelo ambiente. Doses acumulativas cada vez maiores podem ser esperadas em animais senis, com poucos pêlos ou pêlos brancos, e em animais mantidos em regiões externas localizadas em regiões meridionais, ensolaradas ou de grandes altitudes (KRAEGEL; MADEWELL, 2004).

3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Nos cães, o CCE cutâneo ocorre em uma faixa etária média de nove anos, sem predileção por sexo; porém, a faixa etária sob maior risco está entre seis e dez anos de idade. Animais jovens também podem ser atingidos assim como os adultos (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Dentre as raças mais acometidas citam-se Boxer, Pequinês, Poodle e Terrier Escocês. O CCE de origem no leito ungueal é mais observado em cães de pelagem preta de raças grandes, especialmente Poodle Standard, Labrador Retriever e Schnauzer gigante (SCOTT *et al.*, 1995). As raças de pêlo curto com pelagem ventral e cor da pele branca ou albina como o Beagle, Bull Terrier, Dálmata e American Stafford Terrier apresentam a incidência mais elevada de CCE induzido pelo sol, já que apresentam áreas na pele com pouca pigmentação. Normalmente associa-se a estas raças o histórico de exposição solar elevada. Cães de pelagem clara podem apresentar a neoplasia nas regiões cutâneas abdominal e inguinal, dado o hábito de exposição solar em decúbito ventral e hipopigmentação da região abdominal (WHITE, 1994; SCOTT *et al.* 1995).

A dermatose solar é a primeira alteração significativa nas junções mucocutâneas ou na pele que está com pouco pêlo e sem pigmentação. Eritema, edema e descamação são seguidos por formação de crostas e adelgaçamento da epiderme com subsequente ulceração. A segunda alteração é o aparecimento de queratose actínica, que exhibe hiperplasia dérmica, hiperqueratose, paraqueratose, acantose, aumento da rede dérmica e displasia dos queratinócitos. O aumento do número destes queratinócitos anormais leva à formação do carcinoma *in situ* e, por fim, ao carcinoma de células escamosas (Figura 1). Quando o tumor começa a invadir a derme, a lesão fica mais consistente. Com o tempo, as úlceras aumentam de tamanho e profundidade e infecções bacterianas secundárias resultam em um

exsudato purulento na superfície da massa tumoral (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002).

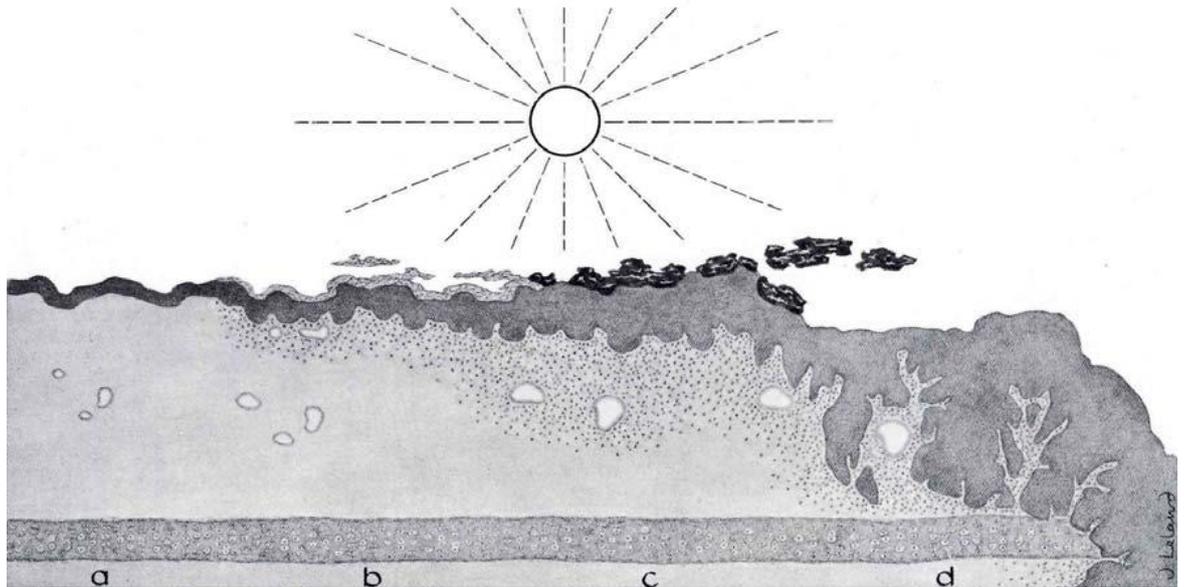


Figura 1: Dermograma da dermatite solar: a - pele e cartilagem normais na pila auricular. b - pele queimada pelo sol, apresentando ligeira acantose, descamação e vasodilatação. c - com o aumento da radiação solar, a pele responde com crescente acantose, células inflamatórias, hiperemia e formação de crostas; d - evolução para o carcinoma epidermóide é o resultado dos contínuos efeitos actínicos da pele susceptível. Massas de células epidérmicas invadem a derme, até a cartilagem (SCOTT *et al.*, 1996).

As lesões de CCE podem ser proliferativas ou ulcerativas (SCOTT *et al.*, 1995). As lesões pré-neoplásicas aparecem como regiões espessadas, hiperêmicas e eritematosas com descamação superficial, apresentando crostas e cicatrizes (KRAEGEL; MADEWELL, 2004). Os tipos neoplásicos proliferativos são massas nodulares de tamanhos variáveis, de aspecto firme, das quais muitas apresentam aspecto de couve-flor, podendo se estender profundamente no interior da derme (WHITE, 1994; SCOTT *et al.*, 1995). A superfície tende a ser ulcerada e sangra facilmente. Cornos cutâneos podem se desenvolver na superfície de tais lesões. Os tipos ulcerativos inicialmente aparecem como úlceras superficiais e crostosas, que se tornam profundas e crateriformes (SCOTT *et al.*, 1995). As lesões ulcerativas normalmente apresentam margem de pele eritematosa e espessa (KRAEGEL; MADEWELL, 2004).

Embora, na maioria das vezes, o CCE apareça solitário, esta neoplasia pode ser múltipla no tronco dos cães que se expõem em demasia ao sol ou nos leitos ungueais de raças grandes e pelagem escura. Os cães com leitos ungueais acometidos por CCE geralmente apresentam um único dedo afetado, que fica

tumefato e doloroso, com unha disforme ou ausente e corrimento purulento; esses animais são mais predispostos a apresentarem neoplasias múltiplas em outros dedos durante um período de dois a quatro anos (SCOTT *et al.*, 1995). São tumores localmente invasivos e extremamente agressivos, levando à destruição da unha do dígito acometido e, eventualmente, da falange (WHITE, 1994).

No plano nasal, o CCE raramente se manifesta como seqüela de despigmentação associada a condições como lúpus eritematoso discóide, pênfigo eritematoso e vitiligo, que resultam em susceptibilidade aumentada à ocorrência de lesão actínica, ou seja, lesão induzida pelo sol (WHITE, 1994; SCOTT *et al.*, 1995).

Esse tipo de tumor também pode ter origem palpebral, embora seja pouco descrito em cães (SLATTER, 2005).

4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do CCE inicia-se pelo histórico, lesões macroscópicas e pela identificação dos fatores predisponentes (GUÉRIOS *et al.*, 2003). O diagnóstico definitivo poderá ser obtido através do exame histopatológico (ESPLIN *et al.*, 2003).

A citologia pode ser realizada para distinguir lesões reativas ou metastáticas nos linfonodos com volume aumentado. É recomendada a realização de radiografia torácica na tentativa de se localizar metástases naqueles animais com CCE não-relacionados à exposição solar. Nos animais com CCEs induzidos pela luz solar e com linfonodos normais, as radiografias torácicas não são necessárias, mas é sempre indicado que sejam feitas para descartar qualquer possibilidade de metástase pulmonar (KRAEGEL; MADEWELL, 2004).

A imunistoquímica vem sendo utilizada como importante técnica auxiliar no diagnóstico e na caracterização de doenças neoplásicas, pois permite diagnóstico mais preciso e específico (RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

4.1 CITOLOGIA

A citologia pode ser realizada, embora tenha maior valor diagnóstico quando utilizada na avaliação de metástase em linfonodos, coletando o material por aspirado com agulha fina. O exame citológico é utilizado para o estabelecimento do diagnóstico presuntivo (GARMA-AVIÑA, 1994). A morfologia celular individual varia

de células escamosas normais, grandes e maduras, a células pequenas a medianas redondas, com pequena quantidade de citoplasma intensamente basofílico, núcleos redondos com cromatina bastante grosseira, com padrão em cordões, contendo múltiplos nucléolos evidentes, variando em forma e tamanho (Figura 2). O padrão citológico do carcinoma de células escamosas varia dependendo do grau de diferenciação do tumor. Nos carcinomas bem diferenciados, a maioria das células pode ter aspecto praticamente normal, dificultando o diagnóstico da neoplasia. Geralmente, podem ser encontrados alguns grupos de células menos maduras com características nucleares de malignidade. Tumores pouco diferenciados podem conter uma população de características óbvias de malignidade, mas sem evidência de queratinização (COWEL *et al.*, 2009).

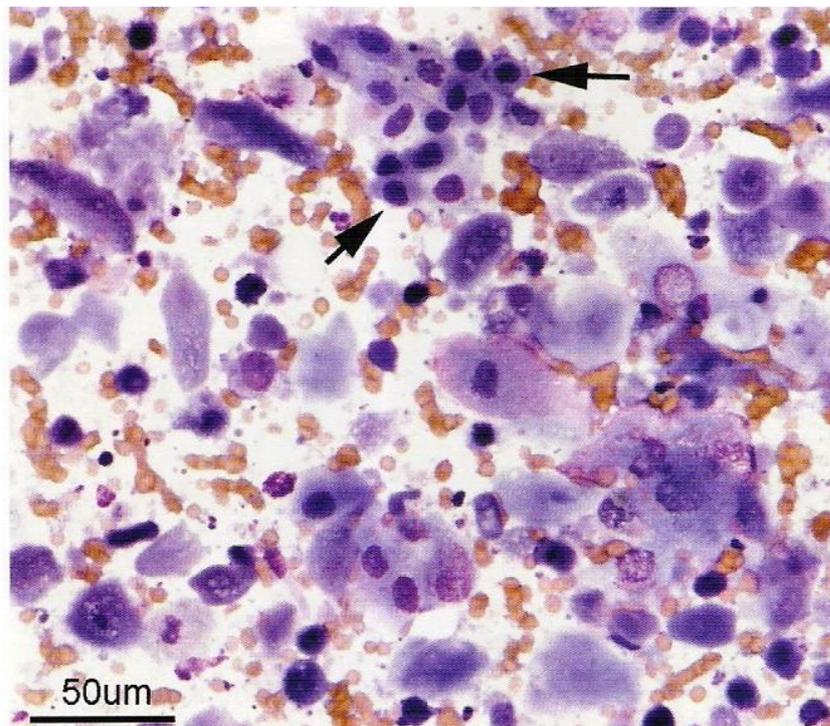


Figura 2: Cão. Pele. Aspirado citológico por agulha fina. Presença de uma densa população de células escamosas. A maioria das células superficiais é queratinizada com núcleo picnótico ou anucleadas. Um agrupado de células relativamente uniformes e não queratinizada está presente (setas). Coloração de Wright, obj. 10x
Fonte: Cowel *et al.* (2009)

4.2 HISTOPATOLOGIA

Microscopicamente, estes tumores consistem de proliferações irregulares de células epiteliais que exibem atipias, mitoses (Figura 3), massas densas de

queratina denominadas pérolas córneas (Figura 4) e pontes intercelulares (Figura 3) (MULLER *et al.*, 1985; WALDER; GROSS, 1992; WILLEMSE, 1995). As massas ou cordões irregulares de células epidérmicas proliferam, estendendo-se em direção à derme e atravessando a membrana basal (MULLER *et al.*, 1985; WHITE, 1994). As células tumorais são poligonais, possuem citoplasma eosinofílico e núcleo grande (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992).

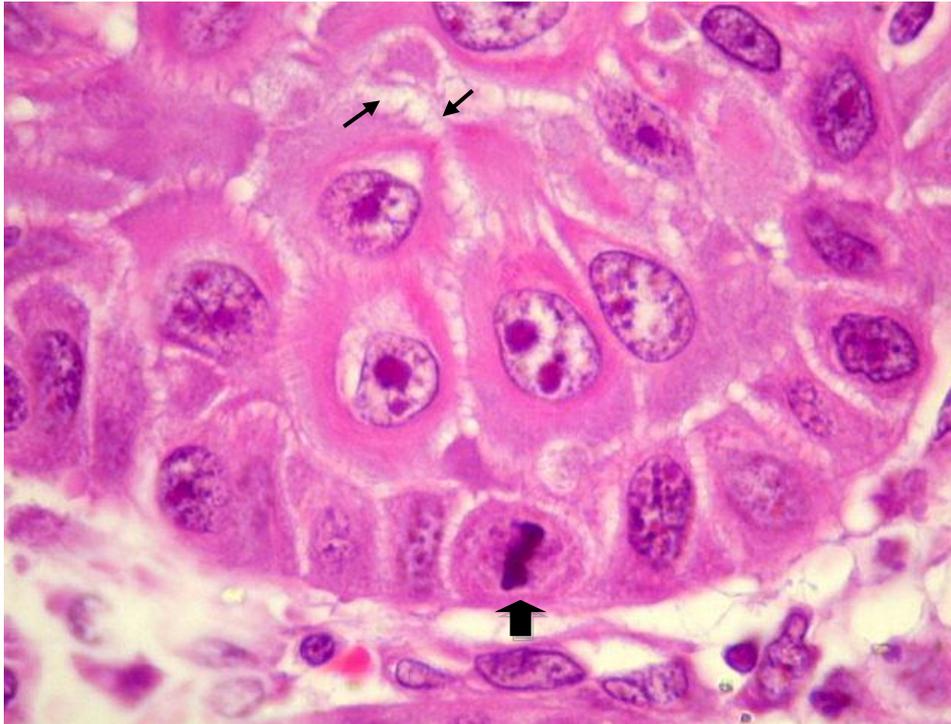


Figura 3: Cão. Microfotografia de CCE apresentando pontes intercelulares (setas pretas) e mitose (seta larga preta). HE. Obj. 100x.

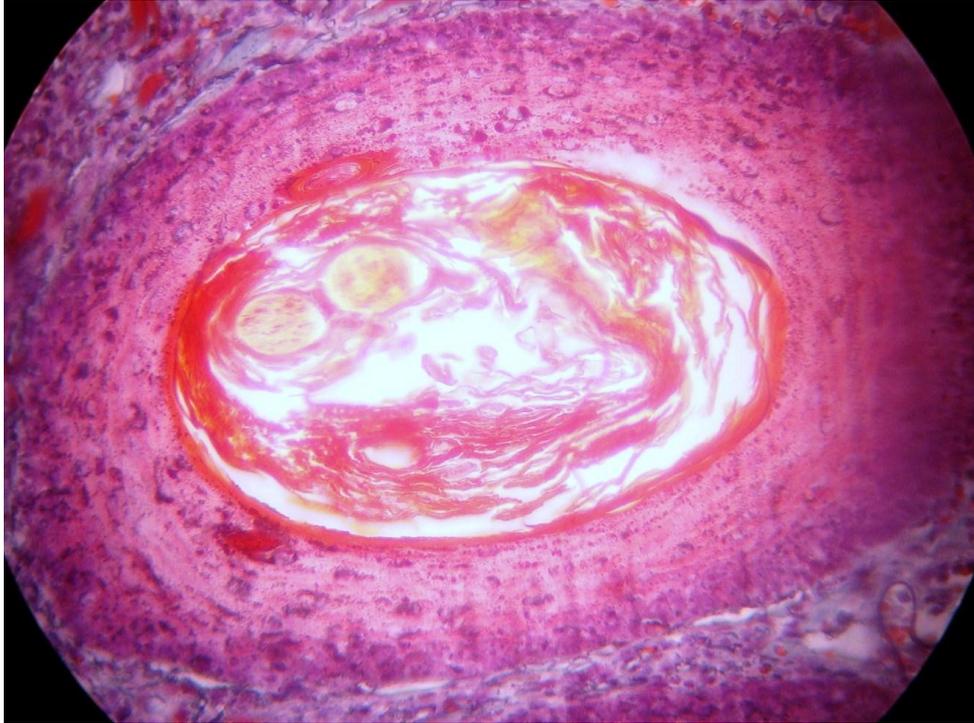


Figura 4: Cão. Microfotografia de CCE com presença de pérolas de queratina (centro). Shorr. Obj. 40x

Ocasionalmente, o carcinoma de células escamosas mostra acantólise marcante. Estes tumores são referidos como carcinoma espinocelular adenóide, acantolítico ou pseudo-glandular, e resultam de formação pseudo-glandular com única camada de células epiteliais queratinizadas envolvendo lúmen preenchido com um grande número de queratinócitos acantolíticos (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; WALDER; GROSS, 1992).

A epiderme adjacente à neoplasia geralmente possui algum grau de hiperplasia queratinocítica consistente com dano solar crônico (WALDER, 1995). Dermatite solar crônica – manifestada por fibrose dérmica e, em menor extensão, elastose solar – é também um achado freqüente (WALDER, 1995). Infiltrado inflamatório abundante também está associado com a maioria dos carcinomas de células escamosas.

De acordo com sistema de gradação histológica de malignidade, desenvolvido por Weiss e Frese (1974), publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que consiste basicamente em uma diferenciação celular, classifica-se o CCE de cães em:

- a) Tumores bem diferenciados: presença de numerosas pérolas córneas,

importante queratinização celular com pontes intercelulares, menos de duas mitoses por campo histológico, observando-se em maior aumento, raras mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzido e presença de infiltrado inflamatório na periferia do tumor.

b) Tumores moderadamente diferenciados: presença de pérolas córneas escassas ou ausentes, queratinização celular e pontes intercelulares aparentes, duas a quatro mitoses por campo histológico, algumas mitoses atípicas e moderado pleomorfismo celular e nuclear.

c) Tumores pouco diferenciados: raras pérolas córneas, queratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de quatro mitoses por campo histológico, freqüentes mitoses atípicas e pleomorfismo celular e nuclear pronunciado.

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A técnica de imunoistoquímica é usada na rotina diagnóstica e na pesquisa em patologia humana desde 1970, porém seu uso na patologia veterinária é relativamente recente, principalmente com objetivo diagnóstico (RUIZ *et al.*, 2005).

A imunoistoquímica consiste no diagnóstico altamente específico e sensível, que utiliza técnicas imunológicas e histológicas para detecção de antígenos através do uso de anticorpos mono ou policlonais em tecidos. O foco principal da imunoistoquímica em Medicina Veterinária é o diagnóstico de neoplasias e doenças infecciosas (RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

A maior dificuldade no uso da imunoistoquímica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Na falta de anticorpos específicos para as espécies domésticas, a patologia veterinária freqüentemente faz uso de anticorpos que podem apresentar reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais. Estudos realizados por Ruiz *et al.* (2005) confirmaram que muitos anticorpos produzidos para o diagnóstico imunoistoquímico em patologia humana podem ser utilizados em patologia veterinária. Porém, novos estudos são necessários a fim de ampliar a lista de aplicabilidade desses anticorpos em diferentes animais, levando sempre em consideração as variações de clones, diluições, métodos de recuperação antigênica e de revelação. Dentre esses anticorpos, constam como os mais freqüentemente utilizados para o diagnóstico de

CCE nos animais domésticos, os seguintes: p53, ki-67, ciclina A e ciclina D₁ (MURAKAMI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2005).

O diagnóstico das neoplasias muitas vezes está baseado na determinação da origem do tecido causador do tumor, que freqüentemente não pode ser detectado pela histopatologia. Usando anticorpos específicos para diferentes tecidos e células, a origem de muitos tumores pode ser determinada. Utilizando anticorpos específicos, a detecção de micrometastases também pode ser visualizada, o que aumenta as chances de sobrevivência através da remoção cirúrgica dos nódulos afetados ou pela mudança no protocolo de tratamento (RAMOS-VARA *et al.*, 2008).

5 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

Os CCEs de origem cutânea apresentam, de uma maneira geral, grande taxa de invasão local, mas são lentos em causar metástases. As lesões do leito ungueal parecem ser mais agressivas, já que cerca de 70% invadem o tecido ósseo da terceira falange, e ocorre metástase mais freqüentemente, com até 22% passando para o linfonodo regional (SCOTT *et al.*, 1995).

Existem várias modalidades de tratamento para o carcinoma de células escamosas, incluindo cirurgia, criocirurgia, cirurgia a laser, radiação ionizante, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia fotodinâmica ou uma combinação de todas as modalidades (STRAW, 1998; SCOTT *et al.*, 2001). O diagnóstico precoce é essencial, já que lesões pequenas podem ser erradicadas (THOMAS; FOX, 2002). O grau de diferenciação celular (THOMAS; FOX, 2002) assim como o tamanho do tumor e a profundidade da erosão são importantes para a determinação do prognóstico (MOORE; OGILVIE, 2001). A escolha do tratamento é dependente não somente do estadiamento do tumor, mas do grau de aceitação do proprietário com relação aos efeitos colaterais e as mudanças estéticas, além da disponibilidade de equipamentos e fármacos (MOORE; OGILVIE, 2001).

Assim como no ser humano, alguns fatores para estabelecer o prognóstico incluem o tamanho do tumor, profundidade da invasão, diferenciação histológica, localização anatômica, invasão perineural, crescimento rápido, histórico de tratamentos anteriores, imunossupressão do hospedeiro e fatores etiológicos como cicatriz de queimaduras, radiação e ulceração crônica (RINKER *et al.*, 2001).

A caracterização do grau de malignidade e do padrão de diferenciação dos

CCEs permite modificações na conduta clínica e prognóstico, além de propiciar novos estudos que possibilitem o maior entendimento da biologia e etiopatogenia dos mesmos.

6 MARCADORES TUMORAIS

Recentes avanços nos conhecimentos de biologia molecular têm proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e a diferenciação celular, bem como o desenvolvimento de metástases. A proliferação celular normal ocorre de forma controlada pela atuação conjunta de fatores promotores, os oncogenes, e de fatores restritivos, denominados genes supressores. O aparecimento do câncer parece ser decorrente da excessiva ativação ou da alteração de expressão dos oncogenes, da perda de função dos supressores ou de ambos os mecanismos, simultaneamente (ANDRIOLO, 2008).

Os marcadores tumorais (ou marcadores biológicos) são macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de células neoplásicas (CAPELOZZI, 2001). Em sua maioria, são proteínas ou pedaços de proteínas, incluindo antígenos de superfície celular, proteínas citoplasmáticas, enzimas e hormônios (ALMEIDA, 2004). Podem ser caracterizados ou quantificados por meios bioquímicos ou imunoistoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas (MATTOS *et al.*, 2001). Sua principal função tem sido como teste laboratorial para apoiar o diagnóstico. Alguns marcadores tumorais são valiosos também para determinar a resposta ao tratamento e indicar a ocorrência de recidiva durante o período de acompanhamento, tanto em seres humanos (LESTER, 2005) como nos animais (MISDORP, 2002; QUEIROGA; LOPES, 2002; ZUCCARI *et al.*, 2004; ZUCCARI *et al.*, 2008).

O marcador tumoral perfeito deve ser altamente específico para um determinado tipo de neoplasia e suficientemente sensível para detectar a presença de pequeno número de células neoplásicas, permitindo o diagnóstico precoce e estabelecimento da extensão da doença, assim como monitorar a resposta terapêutica e detecção precoce de recidiva (GOMES, 1997), permitindo acompanhar temporariamente as mudanças do tumor.

6.1 MARCADORES MOLECULARES DO CICLO CELULAR

6.1.1 Ciclo celular

As células se reproduzem pela duplicação de seus conteúdos e, então, dividem-se em duas. Durante o processo de produção de células-filhas geneticamente idênticas, o material genético precisa ser fielmente replicado e segregado em duas células. O ciclo celular compreende uma seqüência de processos nucleares e citoplasmáticos perfeitamente coordenados, sendo a maneira fundamental pela qual todos os seres vivos são reproduzidos (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os elementos envolvidos com o ciclo celular e, secundariamente, com a carcinogênese são (FARAH, 1997; LOURO, 2000):

- Protooncogene: são genes reguladores fisiológicos da diferenciação e proliferação celular.
- Oncogenes: genes cujos produtos são reguladores importantes do crescimento e da diferenciação de células, pois estimulam a divisão celular. Nas células normais, codificam proteínas reguladoras do ciclo celular e nas células defeituosas causam alterações das funções celulares.
- Genes supressores tumorais: são genes que codificam proteínas inibidoras da proliferação celular, ou relacionadas com a apoptose. A perda, inativação ou mutação, durante a carcinogênese, leva à inibição da apoptose.
- Genes de reparo do DNA: são genes responsáveis pela manutenção da integridade do genoma e pela fidelidade da transferência de informações.

O ciclo celular é composto de quatro estágios: G1, S, G2 e M. Na fase G1 (*gap 1*) há um aumento de tamanho celular e a célula se prepara para a replicação do material genético. Após essa fase, há uma primeira parada do ciclo (*checkpoint R*), quando é verificada a integridade genômica. Durante este evento, qualquer anormalidade da informação genética que seja detectada interrompe a progressão do ciclo até que o reparo seja realizado. A replicação propriamente dita ocorre na fase S (síntese) e permite que a célula duplique precisamente seus cromossomos.

Após a replicação cromossômica, inicia-se a fase G2 (*gap2*), durante a qual a célula se prepara para a fase M (mitose), quando a célula-mãe, aumentada, finalmente divide-se para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos (KASTAN, 1997; ALBERTS *et al.*, 2010). Porém, antes de chegar à fase M (mitose), há uma segunda parada no ciclo (*checkpoint 2*), onde se assegura que as células não entrem em mitose até que o DNA danificado seja reparado e a replicação de DNA seja completa (ALBERTS *et al.*, 2006).

A proliferação e diferenciação celular dependem de eventos coordenados, que incluem: (1) duplicação precisa do DNA; (2) divisão por igual dos cromossomos durante a divisão celular; (3) divisões especificamente programadas para cada tipo celular; e (4) controle diferencial da expressão gênica. O equilíbrio necessário para o funcionamento harmônico destes eventos depende de mecanismos biológicos: (1) incorporação correta das bases nitrogenadas na molécula de DNA em replicação; (2) ligação dos cromossomos ao fuso mitótico e segregação das cromátides irmãs na anáfase; e (3) recepção e tradução corretas dos sinais que induzem a proliferação e a diferenciação celulares (LOURO 2000).

A neoplasia é o resultado de uma seleção natural entre células somáticas e aparece quando alguns controles celulares independentes são perdidos, em decorrência de um número crítico de mutações que irão afetar o crescimento ou a diferenciação celular (BISHOP, 1991). A perda de controle ocorre em decorrência de alterações envolvendo genes ou seus produtos. Tais alterações são chamadas de mutações, que decorrem de: mudanças discretas no DNA, como as mutações de ponto, ou, mudanças mais grosseiras, as quais comprometem a estrutura do cromossomo ou alteram o número cariotípico normal, como translocações, deleções, fusões cêntricas, duplicações, inversões, ampliações, euploidias e aneuploidias (LIU; GEIMANN, 2002).

Muitos tumores resultam destas múltiplas mutações genéticas, cuja combinação final é responsável pela regulação do crescimento e proliferação celular (FUJIKI *et al.*, 2002).

6.1.2 Proteínas reguladoras do ciclo celular

A progressão através do ciclo celular é regulada por uma variedade de proteínas que permitem o correto ordenamento dos eventos de reparo, duplicação e

separação cromossômica. Essas proteínas são denominadas de quinases dependentes de ciclina (CDKs), que nas formas ativas envolvem a formação de complexos específicos, conhecidos como ciclinas (DIAS, 2005). O complexo CDK/ciclina coordena os eventos do ciclo celular através da fosforilação de proteínas, processo este que pode determinar a progressão do ciclo. A proteína pRb, por exemplo, que no estado ativado se encontra hipofosforilada, pode ser fosforilada pelo complexo CDK/ciclina permitindo a progressão do ciclo. A quantidade das ciclinas varia periodicamente durante o ciclo celular, sendo sintetizadas somente em fases específicas do ciclo, de acordo com as necessidades celulares, sendo degradadas após sua utilização (NICULESCU *et al.*, 1998; BRUGAROLAS, *et al.*, 1999; DIAS, 2005; ALBERTS, *et al.*, 2010).

A regulação da formação do complexo CDK/ciclina é realizada por inibidores de ciclinas dependentes de quinases (CKI) que, através do bloqueio da atividade das quinases, promovem a parada do ciclo celular. As CKI da família p21 são inespecíficas e atuam sobre diversos tipos de complexos CDK/ciclina. Já as CKI da família INK4, como as p16^{ink4a}, p18^{ink4c}, p19^{ink4d}, são específicas sobre os complexos CDK/ciclina dos tipos D-CDK4 e D-CDK6, que atuam em G1. Outras proteínas de controle negativo do ciclo celular são as fosfatases, que atuam na fosforilação de CDK e desfosforilação dos complexos CDKs/ciclinas, tornando-os inativos, e as proteínas do complexo ubiquitina, que degradam as ciclinas e outras proteínas e, assim, impedem a progressão do ciclo celular (DIAS, 2005). A ação dessas proteínas repercute na atividade de proteínas inibitórias do ciclo celular ou proteínas supressoras de tumor, como a p53 (DIAS, 2005; ALBERTS *et al.*, 2010).

6.1.2.1 Gene Supressor de Tumor p53 (TP53)

O gene TP53, chamado de “guardião do genoma”, é o gene supressor de tumor mais estudado. No ser humano, está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13. 1) (LEVINE *et al.*, 1991). Composto por 11 éxons intercalados por 10 íntrons (MILLER *et al.*, 1986; ISOBE *et al.*, 1986), codifica uma fosfoproteína nuclear de peso molecular equivalente a 53kD, que contém uma seqüência de 393 aminoácidos (MAY; MAY, 1999). Nos cães, o gene TP53 está localizado no cromossomo 5, é composto por 10 éxons e codifica uma fosfoproteína contendo uma seqüência de 381 aminoácidos, apresentando uma forte homologia

com as demais proteínas p53 identificadas em outros vertebrados (VELDHOEN *et al.* 1998).

A proteína p53 é composta por quatro domínios funcionais principais: um domínio amino-terminal (N-terminal), um extenso núcleo hidrófobo central, uma região de oligomerização e uma região carboxil-terminal (C-terminal) (CHO *et al.*, 1994; MILNER, 1997; MAY; MAY, 1999). A proteína p53 pode ser encontrada na sua forma mutada ou normal (*wild type* ou não mutada). O tipo selvagem da proteína p53, o qual é considerado um regulador de transcrição, presente no núcleo das células de todos os mamíferos, parece estar envolvido na regulação da proliferação celular e apoptose (SCHMITT *et al.*, 1998).

A função do gene TP53 é atuar interrompendo o ciclo celular frente a algum estímulo estressante como danos no DNA ou ativação de oncogenes. Esta parada no ciclo celular permite que o dano seja reparado ou então, sendo o reparo inviável, a célula entra em apoptose (CONTRAN *et al.*, 2000).

A perda de função do gene TP53 pode ocorrer de duas formas básicas (CHANG *et al.* 1995):

- Alterações no gene TP53, determinando a ocorrência de proteína alterada;
- Inativação funcional da proteína p53, pela formação de complexos protéicos com oncoproteínas virais ou celulares, ou pelo deslocamento da proteína para o citoplasma.

Quando ocorre um dano ao DNA, seja por estímulos mutagênicos físicos e químicos (FORRESTER *et al.*, 1996; CALMELS *et al.*, 1997), a proteína p53 se acumula na célula interrompendo o ciclo celular em G1, antes de entrar na fase S, para que seja feito o reparo do DNA alterado. Se a via de reparo falhar, a proteína p53 pode ativar a via apoptótica. Esse controle é exercido na fase G1 do ciclo celular, impedindo que danos ao DNA sejam repassados a outras gerações celulares (BATASAKIS; EL-NAGGAR, 1995; DELFINO *et al.*, 1997; DARNTN, 1998; NOGUEIRA, 1998; BALINT; VOUSDEN, 2001). A interrupção do ciclo celular em resposta aos estímulos citotóxicos permite o reparo dos danos do DNA e é fundamental para a estabilidade genética e viabilidade de células danificadas. A progressão do ciclo celular para a fase S após lesão do DNA, como a que ocorre em células tumorais com p53 mutante, leva à transmissão de mutações para outras células, desencadeando o processo neoplásico (VELCULESCU; EL-DEIRY, 1996).

A princípio, foi atribuído ao gene TP53 um fraco potencial oncogênico. Estes

estudos foram realizados a partir da transformação celular induzida pelo vírus símio (SV-40) em células neoplásicas de humanos e roedores. No final dos anos 80, descobriu-se então que as linhagens de células neoplásicas utilizadas continham uma forma mutante de p53, e estudos com a forma original da proteína revelaram seu papel importante na proteção das células da transformação neoplásica. O papel crítico na carcinogênese atribuído ao p53 veio com a descoberta de que suas mutações estavam presentes em uma grande variedade de cânceres humanos (HUSSAIN; HARRIS, 2006), além de ser a alteração genética mais comum observada em neoplasias malignas (BENNETT *et al.*, 1992).

Mutações no gene TP53 são as mais freqüentes anomalias genéticas encontradas em cânceres humanos, com envolvimento em mais de 50% dos tumores (CONTRAN *et al.*, 1999), sendo que o espectro das mutações varia consideravelmente entre os diferentes cânceres (WELSH *et al.*, 1997). Mais de 98% das mutações no gene TP53 humano estão no éxons 5 a 8, que apresentam 4 a 5 regiões conservadas durante a evolução e parecem ser críticas para sua função normal (JOHNSON *et al.*, 1998). Nos cães, a região correspondente aos éxons 3 a 8 foi seqüenciada e apresenta 83% de homologia com a da espécie humana (KRAEGEL *et al.*, 1995). A mutação predominante é a “*missense*”, no qual as proteínas codificadas para a tradução pelo gene mutado apresentam troca de aminoácidos e, desta forma, tem sua função alterada. Estas alterações não apenas inativam a função supressora de tumor do gene TP53, mas também interferem em genes que o TP53 atua como fator de transcrição, aumentando assim seu potencial oncogênico (HUSSAIN; HARRIS, 2006).

As mutações observadas no gene TP53 podem promover perda da função da proteína codificada embora, em sua maioria, a proteína alterada apresente ganho de função. Alguns pesquisadores têm mostrado que esse aumento de função confere um pior prognóstico em relação a mutações que promovem a perda da função da proteína p53 durante a carcinogênese de tumores de pele. Estes resultados podem influenciar fortemente no desenvolvimento de terapias que desencadeiam aumento da função da p53 (CAULIN *et al.*, 2007).

Há vários métodos de análise do gene TP53 e da proteína p53 no ser humano. A maioria das alterações genéticas (deleções, inserções, inversões e translocações) permite a análise do DNA por métodos como a cariotipagem e hibridização *in situ* fluorescente (FISH); no entanto, para avaliação de mutações

envolvendo uma única base, ou grupos de bases, é necessária a comparação com a forma selvagem. O seqüenciamento direto de um gene, às vezes com vários Kb de extensão, é dispendioso, vagaroso e impraticável quando o número de amostras é grande. A alternativa mais racional é a utilização de técnicas de *screening* de mutações seguidas por seqüenciamento. Estas técnicas diferem em sensibilidade e são baseadas em diferenças no padrão de migração eletroforético ou comportamento cromatográfico entre os mutantes e o DNA de referência (forma selvagem). Estes métodos incluem: polimorfismo conformacional de fita simples de DNA (SSCP: *Strand Conformational Polimorphism*), PCR-heteroduplex, seqüenciamento e FISH. Os métodos de detecção da proteína p53 incluem: imunistoquímica, imunocitoquímica, citometria de fluxo e western blot (KLUMB; JUNIOR, 2002).

Os níveis da proteína p53 são determinados principalmente pelo balanço entre a síntese e a degradação da proteína que está acontecendo na célula. Geralmente em células normais e fora de condições de estresse, a proteína p53 é mantida em baixas concentrações por sua meia vida ser relativamente baixa, cerca de 20 minutos (VOGELSTEIN *et al.*, 2000). Outro mecanismo que permite que p53 se mantenha em baixos níveis na célula é a presença de formas inativas da p53, que para serem ativadas devem receber um sinal ou sofrer alteração para ter sua função ativa. A ativação da p53 se dá por uma variedade de estímulos de estresse, como danos ao DNA, bloqueio na transcrição, hipóxia, sinalização desregulada de oncogenes, exposição à radiação γ , dentre outros (HONG *et al.*, 2006). O aumento dos níveis da p53 se dá provavelmente pelo aumento da meia vida da p53 desencadeado pelo aumento proporcional à extensão do dano ao DNA (LEVINE, 1997). Os três principais mecanismos moleculares que parecem conduzir ao acúmulo excessivo da proteína p53 são as mutações com mudança conformacional, formação de complexos com oncoproteínas virais e expressão anormal do gene TP53 devido a alterações de fatores de transcrição celular. Devido a sua frequência e especificidade do acúmulo excessivo da proteína p53, a detecção de altos níveis dessa proteína tem sido utilizada como biomarcador para o câncer (BENNETT *et al.*, 1992).

Em medicina veterinária, alterações no gene TP53 têm sido reportadas em tumores mamários caninos (MAYR *et al.*, 1998), osteossarcoma canino (MENDOZA *et al.*, 1998), tumores hematopoiéticos felinos (OKUDA *et al.*, 1994), linfomas

caninos (GAMBLIN *et al.*, 1997; VELDHOEN *et al.*, 1998; SETOGUCHI *et al.*, 2001), carcinomas de tireóide caninos (DEVILLEE *et al.*, 1994), e tumores de pele (MAYR *et al.*, 1999). Estudos vêm sendo realizados na utilização da proteína p53 como forma de diagnóstico do carcinoma de células escamosas em cães. De acordo com Mayr *et al.* (1999), os éxons de 4 a 8 estariam envolvidos com as mutações que acontecem na proteína p53 propiciando a formação de câncer. Nesse estudo, os autores constataram em um cão com carcinoma de células escamosas, uma deleção de uma base no códon 89 do éxon 4 (ACC→AC) do gene TP53, sugerindo que essa deleção levaria à formação de p53 defeituosa que seria responsável pela formação do tumor. Não foram constatadas alterações nos demais éxons envolvendo o CCE, e sim, envolvendo outras neoplasias mamárias, sugerindo então que deve haver mais estudos correlacionando o gene TP53 com a formação de tumores em animais (MAYR *et al.*, 1999). Já Teifke e Löhr (1996) analisaram imunistoquimicamente a expressão da proteína p53 mutante e encontraram 28% de imunopositividade em CCE de cães. Estes resultados fornecem respaldo para a visão de que, assim como no homem, a superexpressão da proteína p53 tem um importante papel no desenvolvimento de muitos carcinomas epinocelulares na espécie canina, o que provavelmente decorre da radiação ultravioleta (TEIFKE; LÖHR, 1996).

6.2 E-CADERINA

As moléculas de adesão celular (MACs) são glicoproteínas de membrana, cujas funções compreendem o reconhecimento e a adesão celular e possuem enorme importância em múltiplos processos biológicos, tanto normais como patológicos (ELANGBAM *et al.*, 1997). A adesão celular determina a organização das células em órgãos e tecidos; também é importante nos processos de migração e diferenciação celular. As MACs estão envolvidas na interação entre células e entre células e matriz celular em tumores malignos e benignos (DENTON *et al.*, 1992). Desempenham um papel importante na progressão do câncer, no seu desenvolvimento, invasão e geração de metástases (OKEGAWA *et al.*, 2004). A expressão de moléculas de adesão e seus ligantes nos tumores podem estar relacionados com seu grau de malignidade e seu poder de gerar metástases (WITZ, 2006). São descritas cinco famílias de moléculas de adesão: a superfamília das imunoglobulinas, as selectinas, caderinas, integrinas e as proteínas da matriz

extracelular (ELANGBAM *et al.*, 1997).

As caderinas representam uma família de moléculas de adesão celular transmembrana, dependentes de cálcio, que estabelecem ligação entre as células por meio de interações homofílicas proteína-proteína (NOLLET *et al.*, 1999). O cálcio é essencial para a função adesiva das caderinas que, na sua ausência, sofrem uma enorme alteração conformacional e terminam por ser degradadas por enzimas proteolíticas (TAKEICHI, 1991; KEMLER, 1993; WHEELLOCK; JOHNSON, 2003).

Existem mais de 40 caderinas diferentes conhecidas (LODISH *et al.*, 2000). As caderinas mais estudadas são as caderinas E (epitelial), P (placentária) e N (neural), esta última também chamada de A-CAM ou N-Cal-CAM, conhecidas como caderinas clássicas (ROWLANDS *et al.*, 2000).

Basicamente, as caderinas podem ser subdivididas em dois grupos: caderinas clássicas, que se caracterizam por possuir um domínio citoplasmático altamente conservado e pela capacidade de formar complexos através de interações muito específicas com proteínas intracelulares denominadas cateninas; e caderinas desmossomais, que são proteínas transmembrana componentes dos desmossomos (ROWLANDS *et al.*, 2000; CONACCI-SORREL *et al.*, 2003).

A e-caderina é um elemento da família das caderinas clássicas conhecida por desempenhar um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais (TAKEICHI, 1991; MATOS *et al.*, 2006). O gene que codifica a e-caderina, no ser humano é o CDH1, situado no cromossomo 16q22. A e-caderina, também chamada de uvomorulina, é uma das caderinas mais estudadas, presente em vários tipos de células epiteliais, constituindo uma glicoproteína transmembrana de 120kD envolvida na adesão celular (ALBELDA, 1993; KEMLER, 1993), sendo composta por três domínios: um citoplasmático, um transmembranoso e um extracelular (BEAVON, 2000; HAJRA; FEARON, 2002).

O domínio extracelular da e-caderina se liga, por meio de ligações homofílicas dependentes de cálcio, ao domínio extracelular de uma molécula de e-caderina vizinha, assumindo uma conformação *zíper*. O domínio citoplasmático da e-caderina se liga à actina do citoesqueleto por meio de interações heterotípicas com proteínas chamadas cateninas, estabelecendo o complexo citoplasmático de adesão celular, importante para a formação da adesão extracelular célula-célula (WITCHER *et al.*, 1996; WIJNHOFEN *et al.*, 2000).

Estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida da e-caderina pode

afetar a adesão celular permitindo ou aumentando o risco da progressão tumoral e, dessa forma, é facilitada a diferenciação tumoral, o aumento da invasão e desenvolvimento de metástase (BIRCHMEIER; BEHRENS, 1994; JIANG, 1996).

Em medicina veterinária, o aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de modo geral, têm despertado especial interesse no estudo dos fatores de prognóstico. A e-caderina, como mediadora de adesão intercelular, impede que as células de um tumor primário se soltem e invadam locais próximos ou distantes (KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005). Portanto, é a redução da expressão dessas moléculas um fator facilitador da disseminação das células tumorais (BRUNETTI *et al.*, 2003; KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005). Baseando-se nisso, é sugerido que a redução ou a ausência de expressão da e-caderina nos tumores pode servir como um indicador de prognóstico ruim. No entanto, trabalhos publicados mostram que há divergências a respeito da expressão das e-caderinas como fator prognóstico (KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005).

Alterações envolvendo a e-caderina em medicina veterinária tem sido reportadas em neoplasias mamárias de cadelas (SARLI *et al.*, 2004; PIEKARZ *et al.*, 2008; ZUCCARI *et al.*, 2008), carcinoma de glândula adanal (POLTON *et al.*, 2007), tumores testiculares caninos (OWSTON; RAMOS-VARA, 2007), histiocitoma cutâneo canino (PIRES *et al.*, 2008) e carcinoma de células escamosas e tumores de células basais em cães (JOÃO, 2008).

Investigações sobre o papel funcional das caderinas podem fornecer, além de informações sobre o mecanismo biológico da progressão tumoral, também a identificação de novos alvos moleculares na terapia anti-câncer (CAVALLARO *et al.*, 2002).

6.3 METALOPROTEINASES

Os tecidos animais e vegetais não são constituídos apenas por células, mas também por um espaço extracelular preenchido por um complexo de componentes fibrosos e protéicos denominados de matriz extracelular (MEC) (BORNSTEIN; SAGE, 2002; ALBERTS, 2010). Esta se constitui, em proporções variadas, de proteínas e polissacarídeos, organizados em rede, os quais são responsáveis pela diversidade morfológica, funcional e patológica dos tecidos, fornecendo substrato

adequado para o crescimento e diferenciação dos variados tipos celulares do organismo (CURRAN; MURRAY, 2000; BORNSTEIN; SAGE, 2002).

Dentre os constituintes da MEC referenciam-se vários tipos de macromoléculas (proteoglicanas e glicosaminoglicanas) além das proteínas fibrosas como colágeno e elastina, ambas com função estrutural, e as glicoproteínas adesivas como laminina, tenascina e fibronectina (POTTS; CAMPBELL, 1996).

A MEC se classifica em matriz intersticial, que compreende todo o espaço existente entre as células mesenquimais e membrana basal, a qual é representada pela matriz extracelular especializada em forma de lâmina (ALBERTS, 2010). A interação entre esse complexo protéico e fibroso, proteínas solúveis e receptores de superfície influencia muitas propriedades das células, incluindo migração, proliferação, estágio de diferenciação e apoptose (BORNSTEIN; SAGE, 2002).

Interações e ligações entre as células e componentes da MEC são realizadas por receptores específicos denominados integrinas, que são proteínas transmembranas com um domínio extracelular que se prende a componentes da MEC, e um receptor citoplasmático ligado à porção do citoesqueleto constituída por actina (TOOLE, 2001).

Encontra-se bem estabelecido na literatura que o estroma tumoral relaciona-se diretamente com o comportamento biológico das neoplasias, apesar de que por muito tempo, as células neoplásicas foram foco das principais pesquisas de interesse no câncer (WERNERT, 1997).

A degradação da MEC se constitui em um evento essencial em muitos processos fisiológicos, como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos. Por outro lado, sua excessiva degradação pode acarretar no desenvolvimento de várias condições patológicas, dentre as quais estão as neoplasias (CHAMBERS; MATRISIAN, 1997; WESTERMARCK; KAHARI, 1999). A capacidade de uma célula tumoral infiltrar os tecidos vizinhos e estruturas vitais é uma das características mais importantes de uma neoplasia maligna. O mecanismo de invasão dos tumores epiteliais aos tecidos adjacentes se inicia pela destruição da membrana basal. Este evento requer a síntese e ativação de enzimas proteolíticas, envolvidas na degradação de macromoléculas, que compõem a MEC. Dentre as mais importantes proteínas envolvidas nesse processo estão as metaloproteinases (ROSENTHAL; MATRYSIAN, 2006).

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases dependentes de zinco e de cálcio; portanto, metalodependentes, que são sintetizadas como enzimas latentes e, posteriormente, são ativadas (WOESSNER, 1998; CURRAN; MURRAY, 2000; SOUZA; LINE, 2002; ROSENTHAL; MATRYSIAN, 2006). Essas enzimas funcionam extracelularmente e são capazes de executar funções na manutenção de arquitetura normal da pele. Para isso, as MMPs precisam exercer seus efeitos sobre o depósito, composição e reposição de macromoléculas como o colágeno, a elastina, os glicosaminoglicanos e glicoproteínas (SELTZER; EISEN, 2003).

Para exercerem suas ações fisiológicas no tegumento cutâneo-mucoso, as MMPs são secretadas por células residentes da epiderme e derme como os queratinócitos, fibroblastos, histiócitos e mastócitos, a partir da indução mitocondrial (FIGUEIREDO; DUQUE-MAGALHÃES, 1994; SELTZER; EISEN, 2003). Estas funções são essenciais para a manutenção da morfogênese, da angiogênese e da formação de processos de cicatrização. Alterações da secreção ou regulação destas enzimas podem alterar a degradação das macromoléculas, rompendo o equilíbrio extracelular da derme e contribuindo para o desenvolvimento de processos patogênicos, que podem ser auto-sustentáveis. Entre esses processos, são destacados os envolvidos com determinadas neoplasias, doenças inflamatórias, reações de hipersensibilidade e doenças fibróticas (GÓMEZ *et al.*, 1997; GARBUZENKO *et al.*, 2002; SELTZER; EISEN, 2003).

As MMPs são classificadas de acordo com seu domínio e organização estrutural, além do seu substrato específico para degradação (VISSE; NAGASE, 2003). Apresentam diversas classes, dentre elas, as collagenases, as gelatinases, as estromelisinases, as matrilisinases e as MMP ligadas à membrana (MT-MMP) (WOESSNER, 1998; HIDALGO; ECKHARDT, 2001; VISSE; NAGASE, 2003). Essas enzimas são capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular, bem como outras proteínas importantes para o controle do ciclo celular e para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Entre essas moléculas, que podem ser degradadas pelas MMPs, está o fator de crescimento, as moléculas de adesão e receptores localizados na membrana da célula (STAMENKOVIC, 2000; MUELLER; FUSENIG, 2002; PATEL *et al.*, 2005; ROSENTHAL; MATRYSIAN, 2006).

As colagenases 1, 2 e 3 são as MMP-1, -8 e -13, respectivamente, e degradam as moléculas de colágeno intersticial tipo I, II e III, além de digerirem outras moléculas da MEC (BIERKEDAL-HANSEN, 1995; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003).

As gelatinases A e B (MMP-2 e -9) degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas) e colágeno tipo IV (KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003; WOESSNER, 1991).

As estromelinas 1 e 2 (MMP-3 e -10) podem degradar fibronectina e proteoglicanas (BIERKEDAL-HANSEN, 1995; NABESHIMA *et al.*, 2002).

As matrilisinas 1 e 2 (MMP-7 e -26) digerem diversos componentes da matriz, dentre os quais estão a fibronectina e o colágeno tipo IV (BIERKEDAL-HANSEN, 1995; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003).

As MT-MMP são numeradas de 1 a 6: MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP e MT6-MMP, correspondendo respectivamente às MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25. Além de apresentarem papel importante na ativação das outras MMPs, os subtipos das MT-MMP são responsáveis pela degradação de diferentes componentes da MEC (BIERKEDAL-HANSEN, 1995; NABESHIMA *et al.*, 2002). A nomenclatura e os substratos específicos de cada grupo das MMP estão resumidos na tabela 1.

A organização básica das MMPs é feita em três estruturas: um pró-peptídeo amino-terminal, um domínio catalítico e um domínio “hemopexin-like” na extremidade carboxi-terminal (MASSOVA *et al.*, 1998; ROSEMBERG, 2002b). O N-terminal contém um resíduo de cisteína quelando os íons zinco presentes no centro catalítico, mantendo-as inativas sob a forma de zimogênios (pró MMP-2 – 72 kDa e pró MMP-9 – 92 kDa) e a extremidade C-terminal é o sítio de ligação específica com o substrato (LEPPERT *et al.*, 2001; YONG *et al.*, 2001). Uma vez que a ligação com a cisteína é quebrada, há uma ativação intermediária de tais proteases, a qual é completada com a clivagem autocatalítica do pró-peptídeo do núcleo da proteína, tornando a enzima completamente ativada, com conseqüente perda de peso molecular (MMP-2 – 66 kDa e MMP-9 – 86 kDa) (LEPPERT *et al.*, 2001; YONG *et al.*, 2001).

Tabela 1. Nomenclatura e alguns substratos específicos dos principais grupos das metaloproteinases da matriz extracelular.

Proteína	MMP	Alguns Substratos Específicos
Colagenases		Colágenos I, II e III
Colagenase 1	MMP-1	
Colagenase 2	MMP-8	
Colagenase 3	MMP-13	
Gelatinases		Gelatina e Colágeno IV
Gelatinase A	MMP-2	
Gelatinase B	MMP-9	
Estromelisinases		Fibronectina e Proteoglicanas
Estromelisina 1	MMP-3	
Estromelisina 2	MMP-10	
Matrilisinases		Fibronectina e Colágeno IV
Matrilisina 1	MMP-7	
Matrilisina 2	MMP-26	
MMP ligadas a membrana		
MT1-MMP	MMP-14	Colágenos I, II e III, gelatina e fibronectina
MT2-MMP	MMP-15	Fibronectina e laminina
MT3-MMP	MMP-16	Colágeno III e fibronectina
MT4-MMP	MMP-17	Gelatina e fibronectina
MT5-MMP	MMP-24	Proteoglicanas
MT6-MMP	MMP-25	Gelatina

MMP: metaloproteinase da matriz extracelular, MT-MMP: MMP ligadas à membrana.
 Fonte: PEREIRA *et al.*,(2006).

A principal função biológica das MMPs consiste na modulação da interação das células da matriz extracelular. Elas são responsáveis pela hidrólise de seus componentes, bem como pelo controle dos sinais suscitados por suas moléculas, que regulam a proliferação, diferenciação e morte celular, desta forma regulando a integridade e estrutura da MEC (MANDAL *et al.*, 2003). Assim, a ação destas proteinases deve ser estritamente regulada, pois uma proteólise descontrolada contribui para o desenvolvimento anormal e para a degeneração em muitas condições patológicas, caracterizadas tanto pela excessiva degradação como pela falta de degradação dos componentes da MEC (MASSOVA *et al.*, 1998; ROSEMBERG, 2002b).

Em condições fisiológicas normais, há uma rigorosa regulação da secreção das MMP, que são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas, zimógenos, que posteriormente serão ativadas (WOESSNER, 1991; FINI *et al.*, 1998; ROTHENBERG *et al.*, 1998; HIDALGO; ECKHARDT, 2001). Essa regulação ocorre apenas em momentos específicos, nos quais existem processos multifásicos de ativação dos zimógenos, além de haver vários inibidores sanguíneos e teciduais

para monitorar a ação da proteinase (WOESSNER, 1991). A regulação da atividade destas proteases é feita em três níveis. Primeiramente elas são reguladas em nível transcricional, sendo muitas delas não constitutivas, transcritas somente após ativação celular (YONG *et al.*, 2001). Esta ativação pode ser por meio de citocinas, fatores de crescimento, neuro-hormônios, estresse oxidativo, interações célula-matriz e célula-célula (COX *et al.*, 2002; NAGASE; WOESSNER, 1999). Secundariamente, são reguladas por meio da ativação dos zimogênios por meio da quebra do resíduo de cisteína que fica situada no domínio pró-peptídeo ligando o íon zinco presente no sítio catalítico (YONG *et al.*, 2001). Os fatores de ativação incluem proteinases do tecido ou do plasma, ou proteinases bacterianas oportunistas, plasmina e radicais livres, que rompem a ligação entre a cisteína e o zinco e depois removem o domínio pró-peptídeo para a ativação completa (NAGASE; WOESSNER, 1999; ROSEMBERG, 2002a). Por fim, o controle da atividade se dá pela interação de MMPs ativas com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que as inativam se ligando ao seu sítio catalítico (YONG *et al.*, 2001). O desequilíbrio entre MMP e TIMP pode resultar em várias patologias (BODE; MASKOS, 2003).

Os níveis das MMP nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis (PARKS *et al.*, 1998; HIDALGO; ECKHARDT, 2001). Entretanto, sua expressão é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas, apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase (THOMAS *et al.*, 1999; WYLIE *et al.*, 1999; LI; ANDERSON, 2003; KERKELA; SAARIALHO-KERE, 2003).

O envolvimento das MMPs no processo de degradação da matriz extracelular, incluindo a membrana basal (MB), e, por conseguinte, sua importância no processo de invasão e metástases está confirmada por vários estudos (ROSENTHAL *et al.*, 1998; SABEH *et al.*, 2004). No entanto, já foram identificadas outras funções dessas enzimas no processo de desenvolvimento de uma neoplasia. As MMPs promovem a iniciação e crescimento de diversos tumores ativando fatores de crescimento e permitindo a sua liberação na matriz extracelular (LYN; MATRYSIAN, 2002); podem também inibir a capacidade da célula em reconhecer indutores de apoptose (FINGLETON *et al.*, 2001) e parecem desempenhar alguma função regulatória no processo de angiogênese, aparentemente por estarem envolvidas em mecanismos que fazem parte da mobilização e ativação de fatores angiogênicos como o VEGF

(fator de crescimento vascular endotelial) (STAMENKOVIC, 2000; EGEBLAD; WERB, 2002; DECLERCK *et al.*, 2004).

6.3.1 Gelatinases (MMP-2 e MMP-9)

As MMP-2 e -9 constituem o grupo das gelatinases que recebe esta denominação em função de degradar o colágeno desnaturado (gelatina) e é constituído por dois componentes: gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) (THOMAS *et al.*, 1999; KUBOTA *et al.*, 2000). A MMP-2 possui 72-kDa e tem sua expressão identificada em fibroblastos, na própria célula tumoral e em macrófagos. A MMP-9 possui 92-kDa e pode estar expressa na célula neoplásica, mas também em fibroblastos, em células endoteliais e em macrófagos (ROSENTHAL; MATRYSIAN, 2006).

Estas enzimas são capazes de clivar o colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal, primeira barreira para a progressão de células epiteliais neoplásicas. Desta forma, as gelatinases desempenham um importante papel nos processos de invasão tumoral e metástase (HONG *et al.*, 2000; LEV *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2003; RAUVALA *et al.*, 2005). Além do colágeno tipo IV e gelatina, as MMPs 2 e 9 têm outros substratos, que incluem os colágenos I, V e X e, para a MMP-2, laminina (STAMENKOVIC, 2000).

Devido ao papel importante das gelatinases no desenvolvimento do câncer em humanos, diversos autores têm relacionado os níveis de MMP-2 e -9 com carcinomas epidermóides orais ou de cabeça e pescoço (HONG *et al.*, 2000; TOKUMARU *et al.*, 2000; FRANCHI *et al.*, 2002; KATAYAMA *et al.*, 2004; KATO *et al.*, 2004; VICENTE *et al.*, 2005), carcinomas de pele (FUNDYLER *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2008) e carcinomas de esôfago (KOYAMA *et al.*, 2000; FELIN *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos para detecção dos níveis das MMP-2 e -9 utilizam técnicas de imunistoquímica (HONG *et al.*, 2000; FUNDYLER *et al.*, 2004) e zimografia (IKEBE *et al.*, 1999; KOYAMA *et al.*, 2000). O estudo imunistoquímico com anticorpos mono ou policlonais contra MMP-2 e -9 pode apresentar a localização de cada MMP no tecido tumoral e pode ser comparado com os achados em cortes histopatológicos convencionais. Entretanto, às vezes, pode resultar em falso positivo baseado em reações cruzadas não específicas (STETLER-

STEVENSON *et al.*, 1993). Já a zimografia demonstra a ação proteolítica mais do que a antigenicidade e, assim, fornece medidas semiquantitativas das MMP no tumor, além de distinguir a MMP de forma ativa da pro-enzima (IKEBE *et al.*, 1999). Desta maneira, a avaliação concomitante da zimografia e da imunistoquímica mostra-se importante na detecção das MMP.

Embora a evidência para o papel das MMPs em tumores de animais domésticos seja escassa, estudos envolvendo as MMPs -2 e -9 já foram descritos por Lana *et al.* (2000) em osteossarcoma canino, Leibman *et al.* (2000) em mastocitoma cutâneo canino, Papparella *et al.* (2002) em carcinomas mamários caninos, Loukopoulos *et al.* (2003) em diversos tumores canino e Mandara *et al.* (2009) em meningioma canino e felino.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mais estudos devem ser realizados envolvendo o Carcinoma de Células Escamosas em cães, visto que em países tropicais como o Brasil, onde a exposição crônica de radiação UV é intensa, esta neoplasia é considerada de grande relevância. Sendo assim, a realização de diagnóstico precoce torna-se imprescindível a fim de escolher a modalidade terapêutica que será utilizada e também de estabelecer um prognóstico favorável.

O uso de técnicas histopatológicas aliadas a técnicas de imunohistoquímica permite que esse diagnóstico seja realizado com maior acurácia e confiabilidade, visto que anticorpos produzidos para o diagnóstico imunohistoquímico na patologia humana também podem ser utilizados na patologia veterinária.

A utilização de marcadores imunohistoquímicos como a p53, marcador do ciclo celular, a e-caderina, marcador de adesão celular e as metaloproteinases -2 e -9, marcadores que indicam processo de invasão e metástase, permite caracterizar o CCE, auxiliando na decisão da melhor escolha terapêutica a ser realizada.

Além disso, mais estudos em biologia molecular são necessários a fim de esclarecer a natureza da expressão do CCE nos animais domésticos.

REFERÊNCIAS

- ALBELDA, S. M. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. **Laboratory investigation**. v. 68, n. 1, p. 4-17, 1993.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; JOHNSON, A.; RAFF, M., ROBERTS, K.; WALTER, P.; HOPKIN, K. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed. 2006. 864 p.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 d. New York: Garland Science. 2010. 1268 p.
- ALMEIDA, J.R.C. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. 1 ed. São Paulo: Atheneu. 2004. 358 p.
- ANDRIOLO, A. Marcadores Tumorais Bioquímicos Circulantes (Mesa: Papel da Medicina Laboratorial na Promoção da Saúde). In: 1º CONGRESSO NACIONAL DE SAUDE DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG. 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 2008, p. 1-17.
- BÁLINT, E; VOUSDEN, K. H. Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. **British Journal of Cancer**. v. 82, n. 12, p. 1813-1823, 2001.
- BATASAKIS, G. J.; EL-NAGGAR, A. K. p53: Fifteen Years after Discovery. **Advances in Anatomic Pathology**. v. 2, n. 2, p. 71-88, 1995.
- BEAVON, I. R.G. The e-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. **European journal of cancer**. v. 36, n. 13, 2000.
- BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M. C.; METCALF, R. A.; WELSH, J. A.; SI-MIN ZHU, A. H.; KUSTERS. I.; RESAU, J. H.; TRUMP, B. F.; LANE, D. P.; HARRIS, C.C. p53 mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. **Cancer Research**. v. 52, p. 6092-6097, 1992.
- BIRCHMEIER, W.; BEHRENS, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junction and the prevention of invasiveness. **Biochimica et biophysica acta CR Reviews on cancer**. v. 1198, p. 11-26, 1994.
- BIRKEDAL-HANSEN, H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 7, n. 5, p. 728-35, 1995.
- BISHOP, G.M. Molecular themes in oncogenes. **Cell**. v. 64, p. 235-248, 1991.
- BODE, W.; MASKOS, K. Structural Basis of the Matrix Metalloproteinases and Their Physiological Inhibitors, the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. **Biological Chemistry**. v. 384, n. 6, p. 863-872, 2003.
- BORNSTEIN, P.; SAGE, E.H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Current Opinion in Cell Biology**. v.14, n. 5, p. 608-616, 2002.

BRUGAROLAS, J. ; MOBERG, K. ; BOYD, S.D. ; TAYA, Y.; JACKS, T. ; LEES, J.A. ; Inhibition of Cyclin – Dependent Kinase 2 by p21 is Necessary for Retinoblastoma Protein – Mediated G1 Arrest After Gamma – Irradiation. **Procedures of National Academy of Science USA**. v. 96, p. 1002 – 1007, 1999.

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

CALMELS, L.; HAINUT, P.; OHSHIMA, H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. **Cancer Research**. v. 57, p. 3365-69, 1997.

CAPELOZZI, V.L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.27, n. 6, p. 321-28, 2001.

CARVALHO, T.; VALA, H.; PINTO, C.; PINHO, M.; PELETEIRO, M. Immunohistochemical Studies of Epithelial Cell Proliferation and p53 Mutation in Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. **Veterinary Pathology**. v. 42, p. 66-73, 2005.

CAULIN, C. NGUYEN, T.; LANG, G. A.; GOEPFERT, T. M.; BRINKLEY, B. R.; CAI, W.W.; LOZANO, G.; ROOP, D. R. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct role for gain-and loss-of-function p53 mutation. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 117, n.7, p. 1893-1901, 2007.

CAVALLARO, U.; SCHAFFHAUSER, B.; CRISTOFORI, G. Cadherins and the tumor progression: is it all in a switch? **Cancer Letters**. v. 176, p.123-128, 2002.

CHAMBERS, A.F.; MATRISIAN, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **Journal of the National Cancer Institute**. v.89, n. 17, p. 1260-70, 1997.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; SYRJANEN, K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **Journal of Clinical Oncology**. v.13, 1009-1022, 1995

CHO, Y.; GORINA, S.; JEFFREY, P. D.; PAVLETICH, N. P. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**. v.265, p.346-355, 1994.

CONACCI-SORREL, M.; SIMCHA, I.; BEN-YEDIDIA, T. Auto regulation of E-Cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. **The Journal of Cell Biology**. v. 163, p. 847-857, 2003.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, M. D. V.; COLLINS, M. D. T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio

de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2000.

COX, M.J.; SOOD, H.S.; HUNT, M.J.; CHANDLER, D.; HENEGAR, J.R.; ARU, G.M.; TYAGI, S.C. Apoptosis in the left ventricle of chronic volume overload causes endocardial endothelial dysfunction in rats. **American Journal Physiology of Heart Circulatory Physiology**. v. 282, n. 4, p. 1197-1205, 2002.

COWEL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DeNICOLA, D. B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. 3. Ed. São Paulo: MedVet, 2009, 476 p.

CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **European Journal of Cancer**. v. 36, n. 13, p. 1261-630, 2000.

DARNTN, S. J. p53 demystified. **Molecular Pathology**. v. 51, n. 5, p. 248-253, 1998.

DECLERCK, Y.A.; MERCURIO, A.M.; STACK, M.S.; CHAPMAN, H.A.; ZUTTER, M.M.; MUSCHEL, R.J.; RAZ, A.; MATRISIAN, L.M.; SLOANE, B.F.; NOEL, A.; HENDRIX, M.J.; COUSSENS, L.; PADARATHSINGH, M. Proteases, extracellular matrix and cancer: a workshop of the path B study section. **American Journal of Pathology**. v. 164, p. 1131-39, 2004.

DELFINO, A. B. M.; ERNANDES, C. B.; EDEJAR, T. S. J.; MENDONÇA, R. G.; ORNELLAS, M. H.O envolvimento de genes e proteínas na regulação da apoptose: carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 43, n. 3, p. 1763-1786, 1997.

DENTON, K.J.; STRETCH, J.R.; GATTER, K.C.; HARRIS, A.L. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. **The Journal of Pathology**. v.167, n. 2, p. 187-191, 1992.

DEVILEE, P.; VAN LEEUWEN, I.S.; VOESTEN, A. RUTTEMAN, G. R.; VOS, J.H.; CORNELISSE, C. J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**. v. 14, p. 2039–2046, 1994.

DIAS, E.M. Tbx2 is over expressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. **Cancer Research**. v. 65, p. 2260-2268, 2005.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New function for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature Reviews of Cancer**. v. 2, p. 161-74, 2002.

ELANGBAM, C.S.; QUALLS, C.W.; DAHLGREN, R.R. Cell adhesion molecules-Update. **Veterinary Pathology**. Washington, v. 34, p. 61-73, 1997.

ESPLIN, D.; WILSON, S.; HULLINGER, G. Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs. **Veterinary Pathology**. v.4 0, n.3,p.332-334, 2003.

FARAH, S.B. In: FARAH, S.B. **Da Célula ao DNA**. In: DNA Segredos & Mistérios. 1ª

ed. São Paulo: Sarvier. 276 p. 1997.

FELIN, I.P.D.; GRIVICICH, I.; FELIN, C.R.; FEDRIGO, C.A.; ROCHA, A.B. Expressão imuno-histoquímica das metaloproteinases 2 e 9 não está associada à progressão do carcinoma de células escamosas de esôfago. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 45, n. 4, p. 317-323, 2009.

FERNANDES, C.G. Neoplasias em Ruminantes e Eqüinos. In: **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. 2ª ed. São Paulo: Eds, v. 2, p. 538–544, 2001.

FERREIRA, I.; RAHAL, S. C.; FERREIRA, J.; CORREA, T. P. Terapêutica no carcinoma de células escamosas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.3, p.1027-1033, 2006.

FIGUEIREDO, E.; DUQUE-MAGALHÃES, M.C. Identification, purification and partial characterization of a carboxypeptidase from the matrix of rat liver mitochondria: a novel metalloenzyme. **Biochemical Journal**. v. 300, p. 15-19, 1994.

FINGLETON, B.; VARGO-GOGOLA, T.; CRAWFORD, H.C.; MATRISIAN, L.M. Matrilysin [MMP-7] Expression Selects for Cells with Reduced Sensitivity to Apoptosis. **Neoplasia**. v. 3, n. 6, p. 459-468, 2001.

FINI, M.E.; COOK, J.R.; MOHAN, R.; BRINCKERHOFF, C.E. **Regulation of matrix metalloproteinase gene expression**. In: PARKS, W.C.; MECHAM, R.P. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press. p. 299-356. 1998.

FORRESTER, K.; AMBS, S.; LUPOLD, S. E.; KAPUST, R. B.; SPILLARE, E. A.; WEINBERGT, W. C.; BOSCHOT, E. F.; WANG, X. W.; GELLER, D. A.; TZENG, E.; BILLIAR, T. R.; HARRIS, C. C. Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. **Proceedures of National Academy of Science USA**. v. 93, p. 2442-47, 1996.

FRANCHI, A.; SANTUCCI, M.; MASINI, E.; SARDI, I.; PAGLIERANI, M.; GALLO, O. Expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in carcinoma of the head and the neck: Correlation with p53 status, inducible nitric oxide synthase activity, and angiogenesis. **Cancer**. v. 95, n. 9, p. 1902-1910, 2002.

FUJIKI, T.; HARAOKA, S.; YOSHIOKA, S.; OHSHIMA, K.; IWASHITA, A.; KIKUCHI, M. p53 Gene mutation and genetic instability in superficial multifocal esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**. v. 20, n.4, p.669-79, 2002.

FUNDYLER, O.; KHANNA, M.; SMOLLER, B.R. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. **Modern Pathology**. v. 17, n. 5, p. 496-502, 2004.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Over expression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 58, p. 857-863, 1997.

GARBUZENKO, E.; NAGLER, A.; PICKHOLTZ, D.; GILLERY, P.; REICH, R.; MAQUART, F.X.; LEVI-SCHAFFER, F. Human mast cells stimulates fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 32, n. 2, p. 237-246, 2002.

GARMA-AVIÑA, A. The Cytology of Squamous cell Carcinoma in domestic animals. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, p. 238-246, 1994.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, p. 45-118, 2002.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. **Skin tumors of the dog and cat**. Oxford: Pergamon, 1992. 316p.

GOMES, F.R. Marcadores tumorais (alcances e limites). **Acta Medica Português**. v.10, n. 1, p. 75-80, 1997.

GÓMEZ, E.D.; ALONSO, D.F.; YOSHIJI, H.; THORGEIRSSON, U.P. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **European Journal of Cell Biology**. v. 74, n. 2, p.111-122, 1997.

GUÉRIOS, S. PÊS, M.; GUIMARÃES, F.; ROBES, R.; RODIGHERI, S.; MACEDO, T. Carcinoma de células escamosas do plano nasal em felinos: por que optar pelo tratamento cirúrgico. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.1, n.3, p.203-209, 2003.

HAJRA, M.; FEARON, E.R. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer**. v. 34, n.3, p.255-268, 2002.

HARGIS, A. M.; THOMASSEN, R.W.; RHEIMISTER, R. D.; Chronic Dermatitis and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the beagle dog. **Veterinary Pathology**. v. 14, p. 218-88, 1977.

HARGIS, M. A.; GINN, P. E. The Integument. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. Missouri: Mosby Elsevier, p. 1107-1261, 2007.

HARVEY, R.G; MCKEEVER, J. M. **Manual Colorido de dermatologia do cão e do gato (diagnóstico e tratamento)**. Rio de Janeiro: Revinter. 2004, 240 p.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S.G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 93, n. 3, p.178-93, 2001.

HONG, S.D.; HONG, S.D.; LEE, J.; LIM, C.Y. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncology**. v. 36, p. 207-13, 2000.

HONG, S.; PUSAPATI, S.V.; POWERS, J.T.; JOHNSON, D.G. Oncogenes and the DNA damage response: Myc and E2F1 engage the ATM signaling pathway to activate p53 and induce apoptosis. **Cell Cycle**. v. 5, n.8, p. 801-803, 2006.

HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **Journal of Nippon Medical School**. v. 73, n.2, p. 54-64, 2006.

IKEBE, T.; SHINOHARA, M.; TAKEUCHI, H.; BEPPU, M.; KURAHARA, S.; NAKAMURA, S.; SHIRASUNA, K. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**. v. 17, n. 4, p. 315-23, 1999.

ISOBE, M.; EMANUEL, B. S.; GIVOL, D. *et al.* Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. **Nature**. v.320, p.84-85, 1986.

JIANG, W.G. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. **British Journal of Surgery**. v 83, n. 4, p.437-446, 1996.

JOÃO, C.F. Expressão da e-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. **Dissertação (Mestrado)**. 2008. 60f. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Ambientais. 2008.

JOHNSON, A. S.; COUTO, C.G.; WEGHORST, C.M. Mutation of p53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteossarcoma of the dog. **Carcinogenesis**. v. 19, n.1, p. 213-217, 1998.

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W. **A pele e seus apêndices**. In: Patologia Veterinária. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000, cap.17, p.831-886.

KASTAN, M. B. **Molecular Biology of Cancer: The Cell Cycle**. In : DeVitta V.T.; Helman S.; Rosenberg S. **Cancer: Principles e Practice of Oncology**. 5 Ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, p. 121 – 133, 1997.

KATAYAMA, A.; BANDO, N.; KISHIBE, K.; TAKAHARA, M.; OGINO, T.; NONAKA, S.; HARABUCHI, Y. Expressions of matrix metalloproteinases in early stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. **Clinical Cancer Research**. v. 10, p. 634-640, 2004

KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; KITAORI, N., HUILAN, Z.; MORI, H.; TOIDA, M.; SHIBATA, T. Matrix metalloproteinase 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**. v. 131, n. 6, p. 340-346, 2004.

KEMLER, R. From cadherins to catenins: cytoplasmatic protein interactions and regulation of cell adhesion. **Trends in Genetics**. v. 9, n. 9, p. 317-321, 1993.

KERKELA, E.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Experimental Dermatology**. v. 12, n. 2, p. 109-25, 2003.

KLUMB, C.E.; JUNIOR, G.B.C. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de**

Hematologia e Hemoterapia. v. 24, n.2, p.111-125, 2002.

KNUDSEN K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry.** v. 95, p. 488-496, 2005.

KOYAMA, H.; IWATA, H.; KUWABARA, Y.; IWASE, H.; KOBAYASHI, S.; FUJII, Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oesophageal carcinoma; a study using in situ zymography. **European Journal of Cancer.** v. 36, n. 16, p. 2164-70, 2000.

KRAEGEL, S.A.; PAZZI, K.A.; MADEWELL, B.R. Sequence analysis of canine p53 in the region of exons 3-8. **Cancer Letters.** v.92, p.181-186, 1995.

KRAEGEL, S.A.; MADEWELL, B.R. **Tumores da pele.** In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004, v.1, cap.99, p.555-561.

KUBOTA, Y.; NINOMIYA, T.; OKA, S.; TAKENOSHITA, Y.; SHIRASUNA, K. Interleukin-1- α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in the epithelial cells of Odontogenic Jaw Cysts. **Journal of Dental Research.** v. 79, n. 6, p. 1423-1430, 2000.

KWA, R. E.; CAMPANA, K.; MOY, R. L. Biology of Cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology.** v. 26, p. 1-26, 1992.

LANA, S.E.; OGILVIE, G.K.; HANSEN, R.A.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. **American Journal of Veterinary Research.** v. 61, p.111–114, 2000.

LEIBMAN, N.F.; LANA, S.E.; HANSEN, R.A.; POWERS, B.E.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J.; OGILVIE, G.K. Identification of Matrix Metalloproteinases in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 14, p. 583-586, 2000.

LEPPERT, D.; LINDBERG, R.L.; KAPPOS, L.; LEIB, S.L. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. **Brain Research Reviews.** v. 36, n. 2-3, p.249-257, 2001.

LESTER, S.C. **The breast.** In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.F. Robbins e Cotran Patologia: Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier. 2005. 1592p.

LEV, S.; GILBURD, B.; LAHAT, N.; SHOENFELD, Y. Prevention of tumor spread by matrix metalloproteinase-9 inhibition: old drugs, new concept. **European Journal of Internal Medicine.** v. 13, n. 2, p. 101-103, 2002.

LEVINE, A. J., MOMAND, J., FINLAY, C. A. The p53 tumor suppressor gene. **Nature.** n. 351, p. 453-6, 1991.

LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**. v. 88, p. 323-331, 1997.

LI, W.P.; ANDERSON, C.J. Imaging matrix metalloproteinase expression in tumors. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine**. v. 47, n. 3, p. 201-8, 2003.

LIU, M.C.; GEIMANN, E. P. p53 gene mutations: case study of a clinical marker for solid tumors. **Seminars in Oncology**. v.29, n.3, p.246-257, 2002.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company. 2000. 1184p.

LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology**. v. 40, p. 382–394, 2003.

LOURO, I. D. **Sistemas de Controle Celular**. In: Louro, I.D.; LLERENA, JR, J.C.; MELO, M.S.V.; ASHTON-PROLLA, P.; SCHWARZSMANN, CONFORTI-FROES, N. *Genética Molecular do Câncer*. 1 ed. São Paulo: MSG Produção Gráfica. 272 p. 2000.

LYN, C.C.; MATRYSIAN, L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation**. v. 70, p. 561-73, 2002.

MANDAL, M.; MANDAL, A.; DAS, S.; CHAKRABORTI, T.; SAJAL, C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 252, n. 1-2, p. 305-329, 2003.

MANDARA, M.T.; PAVONE, S.; MANDRIOLI, L.; BETTINI, G. FALZONE, C.; BARONI, M. Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Canine and Feline Meningioma. **Veterinary Pathology**. v. 46, n. 5, p. 836-845, 2009.

MASSOVA, I.; KOTRA, L.P.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. **The FASEB Journal**. v.12, n.12, p.1075-1095, 1998.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GARTNER, F. E-Cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**. v. 134; p. 182-189, 2006.

MATTOS, L.L.; MACHADO, L.N.; SUGIYAMA, M.M.; BOZZETTI, R.M.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia aplicada na detecção de marcadores tumorais. **Arquivo de medicina ABC**. v.30, n.1, p.19-25, 2001.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functions aspects of the protein. **Oncogene**. v.18, p.7621-738, 1999.

MAYR, B.; DRESSLER, A.; REIFINGER, M.; FEIL, C. Cytogenetic alteration in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 59, p. 69-78, 1998.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; ALTON, K. Novel canine tumor suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. **Veterinary Research Communications**. v. 23, p. 285–291, 1999.

MENDOZA, S.; KONISHI, T.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; MILLER, C. W. Status of p53 and MDM2 genes in canine osteosarcoma. **Anticancer Research**. v. 18, p. 4449-4453, 1998.

MILLER, C.; MOHANDAS, T.; WOLF, D.; PROKOCIMER, M.; ROTTER, V.; KOEFFLER, H.P. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. **Nature**. v.319, p.783-784, 1986.

MILNER, J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. **Pathologie Biologie**. Paris, v.45, p.797-803, 1997.

MISDORP, W. **Tumours of the mammary gland**. In: MEUTEN, D.J. Tumours of Domestic Animals. Iowa: Blackwell Publishing. 2002. P. 576-606.

MOORE, A. S; OGILVIE, G.K. Skin tumors. In: OGILVIE, G.K.; MOORE, A.S. **Feline oncology**. USA: Veterinary Learning Systems, 2001. Chap.50, p.398-428.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia dos Pequenos Animais**. 3. ed. São Paulo: Manole. 1985. 935 p.

MULLER, M.M; FUSENIG, N.E. Tumor stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. **Differentiation**. v. 70, n. 9-10, p. 486-497, 2002.

MURAKAMI, Y.; TATEYAMA, S.; RUNGSIPIPAT, A.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, R. Immunohistochemical analysis of Cyclin A, Cyclin D1, p53 in Mammary tumors, Squamous Cell Carcinomas, Basal Cell Tumors of Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Science**. v. 62, n. 7, p. 743-750, 2000.

NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**. v. 52, n. 4, p. 255-64, 2002.

NAGASE, H.; WOESSNER JUNIOR, J.F. Matrix metalloproteinases. **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 31, p. 21491-21494, 1999.

NICULESCU, A.B. ; CHEN, X. ; SMEETS, M. ; HENGST, L. ; PRIVES, C. ; REED, S.I. ; Effects of p21 (Cip1- Waf1) at Both the G1 and The G2-M Cell Cycle Transitions: pRb is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. **Molecular Cell. Biology**. v. 18, p. 629-643, 1998.

NOGUEIRA, R. L. M. **Estudo imunoistoquímico da expressão da proteína p53 e**

sua correlação com lesões benignas e carcinomas da mucosa bucal. 1998. 92 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, 1998.

NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Molecular Cell Biology Research Communications.** v. 2, n. 2, p.77-85, 1999.

OKEGAWA, T.; PONG, R.C.; LI, Y.; HSIEH, J. T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochimica Polonica.** v. 51, p. 445-457, 2004.

OKUDA, M.; UMEDA, A.; SAKAI, T.; OHASHI, T. MOMOI, Y.; YOUN, H.Y; WATARI, T.; GOITSUKA, R.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberrations in hematopoietic tumors. **International Journal of Cancer.** v. 48, p. 602-607, 1994.

OWSTON, M. A. RAMOS-VARA, J.A. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. **Veterinary Pathology.** v. 44, n. 6, p. 936-943, 2007.

PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; PACIELLO, O.; MAIOLINO, P. Expression of metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology.** v. 126, p. 271-276, 2002.

PARKS, W.C.; SUDBECK, B.D.; DOYLE, G.R.; SAARIALHO-KERE, U.K. **Matrix metalloproteinases in tissue repair.** In: PARKS, W.C.; MECHAM, R.P. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press. p.263-98. 1998.

PATEL, B.P.; SHAH, P.M.; ROWAL, U.M.; DESAI, A.A.; SHAH, S.V.; RAWAL, R.M. PATEL, P.S. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. **Journal of Surgical Oncology.** v. 90, n. 2, p. 81-88, 2005.

PEREIRA, A. C.; CARMO, E. D.; SILVEIRA, V. A. S.; AMADEI, S. U.; ROSA, L. E. B. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 52, n. 3, p. 257-262, 2006.

PIEKARZ, C.H.; BIONDO, A.W.; AMORIM, R.L.; RODASKI, S.; BARROS FILHO, I.R.; DE NARDI, A.B. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas. **Archives of Veterinary Science.** v. 13, n. 1, p. 13-21, 2008.

PIRES, I. ALVES, A. RODRIGUES, P. QUEIROGA, F.L. LOPES, C. S. E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytoma . **Veterinary Record.** v. 163, n.2, p. 59-60, 2008.

POLTON, G.A. BREARLEY, M.J.; GREEN, L.M.; SCASE, T.J. Expression of E cadherin in canine anal sac gland carcinoma and its association with survival. **Veterinary and Comparative Pathology.** v. 5, n. 2, p. 232-238, 2007.

POTTS, J.R.; CAMPBELL, I.D. Structure and functions of fibronectin modules. **Matrix Biology**. v.15, n. 5, p. 313-20, 1996.

QUEIROGA, F.; LOPES, C. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos fatores prognósticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.97, p. 2119-2127, 2002.

RAMOS, A. T.; NORTE, D. M.; ELIAS, F.; FERNANDES, C. G. **Carcinoma de células Escamosas em Bovinos, Ovinos e Eqüinos: Estudo de 50 casos** In: Estudo de tumores em Bovinos, Ovinos, Eqüinos e Suínos. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, 2004.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E.J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V.E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 20, n. 4, p.393-413, 2008.

RAUVALA, M.; PUISTOLA, U.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. **Gynecologic Oncology**. v. 99, n. 3, p.656-663, 2005.

RIBEIRO, R. I. M. A.; BORGES JR, P. C.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinasas de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 44, n. 2, p. 115-12, 2008.

RINKER, M. H.; FENSKE, A. N.; SCALF, L. A.; GLASS, L. F. Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer Control**. v. 8, n. 4, p. 354–363, 2001.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in Multiple Sclerosis. **The Neuroscientist**. v. 8, n. 6, p. 586-595, 2002a.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**. v.39, n.3, p.279-291, 2002b.

ROSENTHAL, E.L.; JOHNSON, T.M.; ALLEN, E.D.; APEL, I.J.; PUNTURIERI, A.; WEISS, S.J. Role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in epidermal growth factor – and reather factor: stimulated invasion of carcinoma cells. **Cancer Research**. v. 58, p. 5221-30, 1998.

ROSENTHAL, E.L.; MATRYSIAN, L.M. Matrix metalloproteases in head and neck cancer. **Head & Neck**. v. 28, n. 7, p. 639-48, 2006.

ROTHENBERG, M.L.; NELSON, A.R.; HANDE, K.R. New drugs on the horizon: matrix metalloproteinase inhibitors. **The Oncologist**. v. 3, n. 4, p. 271-4, 1998.

ROWLANDS, T.M.; SYMONDS, J.M.; FAROOKHI, R.; BLASCHUK, O.W. Cadherins: crucial regulators of structure and function in reproductive tissues. **Reviews of**

Reproduction. v. 5, p. 53-61, 2000.

RUIZ, F.S.; ALESSI, A.C.; CHAGAS, C.A.; PINTO, G.A.; VASSALO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** v. 41, n. 4, p.263-270, 2005.

SABEH, F.; OTA, I.; HALMBECK, K.; BIERKDAL-HANSEN, H.; SOLOWAY, P.; BALBIN, M.; LOPEZ-OTIN, C.; SHAPIRO, S.; INADA, M.; KRANE, S.; ALLEN, E.; CHUNG, D.; WEISS, S.J. Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **The journal of Cell Biology.** v. 167, n. 4, p. 769-81, 2004.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; DE TOLLA, L.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 16, n. 6, p. 542-547, 2004.

SCHMITT, F.C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathology Research and Practice.** v.194, p.815-819, 1998.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Tumores neoplásicos e não neoplásicos.** In: Dermatologia de pequenos animais. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. cap.19, p.926-1054, 1995.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk Dermatologia de Pequenos Animais.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros Edições Ltda. 1996. 1142 p.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk – Dermatologia dos Pequenos Animais.** 6. Ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. 1528 p.

SELTZER, J.L.; EISEN, A.Z. **The role of extracellular matrix metalloproteinases in connective tissue remodeling.** In: FREEDBERG, I.M.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; AUSTEN, K.F.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S. *Dermatology in General Medicine.* 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003, p. 200-209.

SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINEHATA, K.; YASAWA, M.; ISHISAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research.** v. 62, p. 433-439, 2001.

SLATTER, D. **Pálpebras.** In: Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3^a ed. São Paulo: Roca, 2005, cap.7, p.159-220.

SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade Odontológica de Bauru.** v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology.** v. 10, n. 6, p. 415-33, 2000.

STETLER-STEVENSON, W.G.; AZNAVOORIAN, S.; LIOTTA, A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. **Annual Review of Cell Biology**. v. 9, p. 541-73, 1993.

STRAW, R.C. Resection of the nasal planum. In: BOJRAB, M.J. *et al.* **Current techniques in small animal surgery**. 4. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. Chap.20, p. 343-346.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator. **Science**. v. 251, n. 5000, p. 1451-1455, 1991.

TEIKFE, J.; LOHR, C. Immunohistochemical detection of p53 over expression in paraffin wax- embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v.114, p. 205-210, 1996.

THOMAS, G.T.; LEWIS, M.P.; SPEIGHT, P.M. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncology**. v. 35, n. 3, p. 227-33, 1999.

THOMAS, R.C; FOX, L.E. Tumors of the skin and subcutis. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats**. 2. ed. Jackson: Teton NewMedia, 2002. Chap.32, p.469-488.

TOKUMARU, Y.; FUJII, M.; OTANI, Y.; KAMEYAMA, K.; IMANISHI, Y.; IGARASHI, N.; KANSAKI, J. Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples an in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts. **Cancer Letters**. v. 150, n. 1, p. 15-21, 2000.

TOOLE, E.A. Extracellular matrix and keratinocyte migration. **Experimental Dermatology**. v.26, n. 6, p. 525-30, 2001.

TSAI, C.H.; HSIEH, Y.S.; YANG, S.F.; CHOU, M.Y.; CHANG, Y.C. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase inhibitors: preliminary observations. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 95, n. 6, p. 710-716, 2003.

VELCULESCU, V.E.; EL-DEIRY, W.S. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. **Clinical Chemistry**. v. 42, n. 6, p. 858-68, 1996.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**. v. 16, p. 249-255, 1998.

VICENTE, J.C.; FRESNO, M.F.; VILLALAIN, L.; VEGA, J.A.; VALLEJO, G.H. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v. 41, n. 3, p. 283-293, 2005.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**.

v.92, n. 8, p. 827-39, 2003.

VOLGESTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**. v.408, n.16, p. 307-310, 2000.

WALDER, E. J. Comparative aspects of non melanoma skin cancer. **Clinical Dermatology**. v. 13, p. 569-578, 1995.

WALDER, E.J.; GROSS, T.L.; Epithelial Tumors. In: Gross, T.L.; Ihrke, P.J.; Walder, E.J. **Veterinary Dermatopathology – a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. Boston: Mosby Year Book, 1992, p. 329-520.

WEISS, E.; FREZE, K. Tumours of the Skin. In: **Bulletin of the World Health Organization–International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. v. 50, n.1-2, p. 79–100, 1974.

WELSH, J.A.; CASTRÉN, K.; VAHAKANGAS, K.H. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. **Clinical Chemistry**. v. 42, n.12, p. 2251-2255, 1997.

WERNERT, N. The multiple roles of tumor stroma. **Virchows Archive**. v. 430, n. 6, p. 433-43, 1997.

WESTERMARCK, J.; KAHARI, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **The FASEB Journal**. v.13, p. 781-91, 1999.

WHEELOCK, M.J.; JOHNSON, K.R. Cadherins as modulators of cellular phenotype. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 19, p. 207-235, 2003.

WHITE, S. D. Diseases of the nasal planum. **Veterinary Clinic North American Small Animal Practice**. v.24, n.5, p. 887-895, 1994.

WIJNHOFEN, B. P. L.; DINJENS, W. N. M.; PIGNATELLI, M. Cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. **British Journal of Surgery**. v87, n. 8, p. 992-1005, 2000.

WILLEMSE, T. **Dermatologia Clínica de cães e gatos**. São Paulo: Manole. 1995.141 p.

WITCHER, L.L.; COLLINS, R.; PUTTAGUNTA, S.; MECHANIC, S.E.; MUNSON, M.; GUMBINER, B.; COWIN, P. Desmosomal Cadherin binding domains of plakoglobin. **The Journal of Biological Biochemistry**. v. 271, p. 10904-10909, 1996.

WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3 ed. Philadelphia: Pennsylvania, p. 381-383, 2007.

WITZ, I. P. The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression. **Immunology Letters**. v. 104, p. 89-93, 2006.

WOESSNER JR, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective

tissue remodeling. **The FASEB Journal**. v. 5, n. 8, p. 2145-54, 1991.

WOESSNER JR, J.F. **The matrix metalloproteinase family**. In: PARKS, W.C.; MECHAM, R.P. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998. p.1-14.

WYLIE, S.; MACDONALD, I.C.; VARGHESE, H.J.; SCHMIDT, E.E.; MORRIS, V.L.; GROOM, A.C.; ET AL. The matrix metalloproteinase inhibitor batimastat inhibits angiogenesis in liver metastases of B16F1 melanoma cells. **Clinical and Experimental Metastasis**. v. 17, n. 2, p. 111-7, 1999.

YONG, V.W.; POWER, C.; FORSYTH, P.; EDWARDS, D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**. v. 2, n. 7, p. 502-511, 2001.

ZUCCARI, D.A.P.C.; PAVAM, M.V.; CORDEIRO, J.A.; SANTANA, A.E. A imunoexpressão das citoqueratinas como marcadores diagnósticos e prognósticos nas neoplasias mamárias caninas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 99, n. 551, p. 173-178, 2004.

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

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P53, E-CADERINA E METALOPROTEINASES 2 E 9 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CÃES

*(Characterization of morphological parameters and evaluation of the expression of
p53, e-cadherin and matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine Squamous Cell
Carcinoma)*

CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS PARAMETROS MORFOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA P53, E-CADERINA E METALOPROTEINASES 2 E 9 EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CÃES

(Characterization of morphological parameters and evaluation of the expression of p53, e-cadherin and matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine Squamous Cell Carcinoma)

Paula Mayumi Ono¹; Cristina Santos Sotomaior²

¹Mestranda em Ciência Animal – PUCPR, médica veterinária;
paulinha_ono@yahoo.com.br

² Médica Veterinária, PUCPR, cristina.sotomaior@pucpr.br;

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar os parâmetros morfológicos, determinar o grau de malignidade e avaliar a expressão da p53, e-caderina e metaloproteinases -2 e -9 em carcinoma de células escamosas de cães, foi realizado um estudo retrospectivo dos casos de CCE de cães de 1996 a 2009. O material foi obtido nos arquivos do Laboratório de Patologia Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Foram selecionadas 13 amostras de CCE de cães, dentro de 63 amostras de CCE encontradas em animais domésticos. Os parâmetros morfológicos analisados foram: pleomorfismo nuclear e celular, número de mitoses, presença de pérolas de queratina, pontes intercelulares, cordões ou fileiras, população densa de células neoplásicas, estroma, metaplasia, estágio de invasão e tipo de infiltrado inflamatório. Dos 13 tumores, 38,5% foram classificados como bem diferenciados, 38,5% como moderadamente diferenciados e 11% como pouco diferenciados. O principal parâmetro utilizado para caracterizar o CCE foi o pleomorfismo celular e nuclear, que se manteve consistente com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), divergindo somente em 7,7% das amostras. Outros parâmetros como número de mitoses, pérolas de queratina e pontes intercelulares apresentaram divergências em 23 a 46% das amostras analisadas. Em relação às MMP-2 e -9, quatro amostras apresentaram imunoexpressão para ambas as metaloproteinases e em três amostras foi observada a ausência da expressão. As divergências encontradas podem indicar a necessidade de análises mais precisas destes parâmetros morfológicos para a classificação de CCE em cães. Das sete amostras analisadas pela imunoistoquímica, em nenhuma foi observada a expressão das proteínas p53 e e-caderina. As MMP-2 e -9 parecem apresentar um papel importante no comportamento agressivo no carcinoma de células escamosas e o emprego destes marcadores na rotina da histopatologia veterinária poderia servir como indicador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas em cães.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas. Histologia. Imunoistoquímica. MMP-2. MMP-9.

ABSTRACT

Aiming to characterize the morphological parameters, determine the degree of malignancy and to evaluate the expression of p53, E-cadherin and matrix metalloproteinases -2 and -9 in squamous cell carcinoma of dogs, we performed a retrospective study of cases of SCC of dogs 1996-2009. The material was collected in the archives of the Laboratory of Animal Pathology at the Catholic University of Parana. We selected 13 samples of CCE in dogs within 63 samples of SCC found in domestic animals. The morphological parameters analyzed were nuclear and cellular pleomorphism, number of mitoses, presence of keratin pearls, intercellular bridges, strings or rows, dense population of neoplastic cells, stromal, metaplasia, stage of invasion and type of inflammatory infiltrate. Of the 13 tumors, 38.5% were classified as well differentiated, 38.5% moderately differentiated and 11% as poorly differentiated. The main parameter used to characterize the CCE was the cellular and nuclear pleomorphism, which remained consistent with the classification of the World Health Organization (WHO), differing only in 7.7% of samples. Other parameters such as number of mitoses, keratin pearls and intercellular bridges were differences in 23-46% of the samples. Of the seven samples analyzed by immunohistochemistry, any expression of p53 and E-cadherin was observed. With regard to MMP-2 and -9, four samples showed immunoreactivity for both MMPs and three samples lack of expression were observed. The divergences may indicate the need for more accurate analysis of morphological parameters for the classification of CCE in dogs. The MMP-2 and -9 appear to play an important role in aggressive behavior in squamous cell carcinoma and the use of these markers in routine veterinary histopathology could serve as a prognostic indicator for squamous cell carcinoma in dogs.

Key-words: Squamous Cell Carcinoma. Histology. Immunohistochemistry. MMP-2. MMP-9

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna da epiderme, relativamente comum em homens e animais, podendo ter ampla variedade de formas clínicas (PARADIS *et al.*, 1989), sendo que sua origem são os queratinócitos.

A etiologia do CCE não é clara e nem pode ser definida em todos os casos (SCOTT *et al.*, 1995). Sabe-se que as neoplasias cutâneas desenvolvem-se secundariamente a mudanças moleculares básicas que causam danos ao DNA como a radiação ultravioleta (UV), principal causa do aparecimento de CCE. Quatro categorias de genes são responsáveis pela maioria da produção das proteínas reguladoras da proliferação e diferenciação celular. Os danos causados nesses genes levam a um desarranjo na proliferação celular pela expressão anormal do

gene ou na função das proteínas, como os fatores de crescimento, receptores do fator de crescimento, proteínas sinalizadoras da tradução, regulação do ciclo celular e fatores de transcrição nuclear (HARGIS; GINN, 2007). O CCE ocorre com mais frequência na pele lesionada pelo sol e pode ser precedida por uma queratose actínica tornando mais susceptível as áreas submetidas à maior exposição solar (SCOTT *et al.*, 1995). Esse tipo de neoplasia possui elevada incidência em animais com pouco pêlo, com pele despigmentada ou levemente pigmentada (KRAEGEL; MADEWELL, 2004). Assim sendo, o CCE é visto com mais frequência em áreas geográficas caracterizadas por longos períodos de radiação UV, como é o caso do Brasil. Raramente o CCE em cães foi relatado emergindo de cicatrizes de queimaduras ou de processos infecciosos, como é frequentemente visto no ser humano (GOURLEY *et al.*, 1982; MILLER; SHANLEY, 1991).

O tumor pode atingir tanto os animais mais jovens como os adultos e a faixa etária sob maior risco está entre seis e dez anos de idade. O CCE pode ocorrer em qualquer região do corpo nas diferentes espécies (FERNANDES, 2001; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Nos cães, os locais mais comuns são o pavilhão auricular, lábios, pálpebras, o leito das unhas, bolsa escrotal, plano nasal, membros posteriores, abdômen, períneo e ânus (SCOTT *et al.*, 1996; THOMAS; FOX, 2002) e afetam principalmente cães das raças de pêlo curto e com pele branca como: Beagle, Poodle, Labrador, Bull Terrier, Dálmatas e American Stafford Terrier. Outras raças que não tem pelagem branca como: Basset Hound, Terrier Escocês, Pequinês, Boxer, Whippet, Schnauzer e o Collie, também são predispostas (SCOTT *et al.*, 2001; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; FERREIRA *et al.*, 2006; WITHROW; MACEWEN, 2007).

O carcinoma na pele é localmente invasivo, destrutivo, proliferativo e provoca ulceração na epiderme, mas, geralmente, com baixo potencial metastático (PARADIS *et al.*, 1989; MAIOLINO *et al.*, 2001; ESPLIN *et al.*, 2003).

A afecção pode estar presente por meses ou anos e, em geral, a história clínica está associada a um ferimento que não cicatriza. Inicialmente as lesões são proliferativas, eritematosas e crostosas, as quais evoluem para úlceras com invasão dos tecidos adjacentes (FERREIRA *et al.*, 2006). Os carcinomas escamosos são usualmente solitários e podem ser de dois tipos: produtivos ou erosivos. Os produtivos possuem aspecto papilar de tamanho variável com aspecto de couve-flor, normalmente com superfície ulcerada e sangram com facilidade. Os erosivos são os

mais comuns e são formados por úlceras cobertas com crostas, que se tornam profundas e formam crateras (FERNANDES, 2001).

Histologicamente, esta neoplasia é classificada através de um sistema de gradação histológica de malignidade, desenvolvida por Weiss e Frese (1974), publicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que consiste basicamente em uma diferenciação celular onde os tumores são classificados em:

- a) Tumores bem diferenciados: presença de numerosas pérolas córneas, importante queratinização celular com pontes intercelulares, menos de duas mitoses por campo histológico, observando-se em maior aumento, raras mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzido e presença de infiltrado inflamatório na periferia do tumor.
- b) Tumores moderadamente diferenciados: presença de pérolas córneas escassas ou ausentes, queratinização celular e pontes intercelulares aparentes, duas a quatro mitoses por campo histológico, algumas mitoses atípicas e moderado pleomorfismo celular e nuclear.
- c) Tumores pouco diferenciados: raras pérolas córneas, queratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de quatro mitoses por campo histológico, freqüentes mitoses atípicas e pleomorfismo celular e nuclear pronunciado.

A caracterização do grau de malignidade e do padrão de diferenciação dos CCE é importante, pois permite modificações na conduta clínica e prognóstico dos mesmos.

Embora o exame histopatológico seja considerado o diagnóstico de escolha, a citologia pode ser realizada para diferenciar lesões reativas ou metastáticas nos linfonodos com volume aumentado (KRAEGEL; MADEWELL, 2004).

Assim como na medicina humana, a imunoistoquímica pode ser utilizada como um auxílio na classificação de diversos tumores em medicina veterinária (POWERS, 2007). A aplicação da imunoistoquímica tem trazido informações úteis, pois permite determinar com maior precisão a presença de marcadores tumorais, a taxa de proliferação celular, a angiogênese e a presença de produtos de proto-oncogenes e de genes supressores tumorais (MISDORP *et al.*, 1999; CAVALCANTI; CASSALI, 2006).

O uso da imunoistoquímica em patologia veterinária apresenta algumas limitações devido à falta de anticorpos espécie-específicos (RUIZ *et al.*, 2005;

RUTTEMAN *et al.*, 2007). De acordo com Ruiz *et al.* (2005), muitos anticorpos produzidos para o diagnóstico imunistoquímico em patologia humana podem ser utilizados em patologia veterinária. Em alguns casos, porém, há reatividade cruzada entre antígenos humanos e animais (RUIZ *et al.*, 2005).

Alguns dos anticorpos mais utilizados para o diagnóstico de CCE nos animais domésticos são: p53, ki-67, e-caderina, ciclina A e ciclina D₁ (MURAKAMI *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2005, JOÃO, 2008).

Nos cães, o gene TP53 está localizado no cromossomo 5 e codifica uma fosfoproteína contendo uma seqüência de 381 aminoácidos, apresentando uma forte homologia com as demais proteínas p53 identificadas em outros vertebrados (VELDHOEN *et al.*, 1998). A função do gene TP53 é atuar interrompendo o ciclo celular frente a algum estímulo estressante como danos no DNA ou ativação de oncogene. Esta parada no ciclo celular permite que o dano seja reparado ou então, sendo o reparo inviável, a célula entra em apoptose (CONTRAN *et al.*, 2000). Mutações no gene TP53 são as mais freqüentes anomalias genéticas encontradas em cânceres humanos, com envolvimento em mais de 50% dos tumores (CONTRAN *et al.*, 1999). Em medicina veterinária, alterações no gene TP53 têm sido reportadas em tumores mamários caninos (MAYR *et al.*, 1998), osteossarcoma canino (MENDOZA *et al.*, 1998), linfomas caninos (GAMBLIN *et al.*, 1997; VELDHOEN *et al.*, 1998; SETOGUCHI *et al.*, 2001), carcinomas de tireóide caninos (DEVILEE *et al.*, 1994), e tumores de pele (MAYR *et al.*, 1999). Estudos vêm sendo realizados na utilização da proteína p53 como forma de diagnóstico do CCE em cães. Teifke e Löhr (1996) analisaram imunistoquimicamente a expressão da proteína p53 mutante e encontraram 28% de imunopositividade em CCE de cães. Estes resultados fornecem respaldo para a visão de que, assim como no homem, a superexpressão da proteína p53 tem um importante papel no desenvolvimento de muitos carcinomas espinocelulares na espécie canina, o que provavelmente decorre da radiação ultravioleta.

A e-caderina é um elemento da família das caderinas clássicas conhecida por desempenhar um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais (TAKEICHI, 1991; MATOS *et al.*, 2006). Estudos indicam que a perda ou a expressão reduzida da e-caderina pode afetar a adesão celular permitindo ou aumentando o risco da progressão tumoral e, dessa forma, é facilitada a diferenciação tumoral, o aumento da invasão e desenvolvimento de metástase

(BIRCHMEIER; BEHRENS, 1994; JIANG, 1996). Em medicina veterinária, o aumento na casuística e a complexidade na evolução clínica dos tumores de modo geral, têm despertado especial interesse no estudo dos fatores de prognóstico. A e-caderina, como mediadora de adesão intercelular, impede que as células de um tumor primário se soltem e invadam locais próximos ou distantes (KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005). Portanto, é a redução da expressão dessas moléculas um fator facilitador da disseminação das células tumorais (BRUNETTI *et al.*, 2003; KNUDSEN; WHEELLOCK, 2005). Baseando-se nisso, é sugerido que a redução ou a ausência de expressão da e-caderina nos tumores pode servir como um indicador de prognóstico ruim. Alterações envolvendo a e-caderina em medicina veterinária tem sido reportadas em neoplasias mamárias de cadelas (SARLI *et al.*, 2004; PIEKARZ *et al.*, 2008; ZUCCARI *et al.*, 2008), carcinoma de glândula adanal (POLTON *et al.*, 2007), tumores testiculares caninos (OWSTON; RAMOS-VARA, 2007), histiocitoma cutâneo canino (PIRES *et al.*, 2008) e carcinoma de células escamosas e tumores de células basais em cães (JOÃO, 2008)

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma de família de endopeptidases dependentes de zinco e de cálcio que degradam a matriz extracelular (MEC). A degradação da MEC se constitui em um evento essencial em muitos processos fisiológicos como durante o desenvolvimento embrionário, crescimento e reparo dos tecidos. Por outro lado, sua excessiva degradação pode acarretar no desenvolvimento de várias condições patológicas, como as neoplasias (CHAMBERS; MATRISIAN, 1997; WESTERMARCK; KAHARI, 1999). As MMP-2 e -9 constituem o grupo das gelatinases que recebe esta denominação em função de degradar o colágeno desnaturado (gelatina) e o colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal, primeira barreira para a progressão de células epiteliais neoplásicas. Embora a evidência para o papel das MMPs em tumores de animais domésticos seja escassa, estudos envolvendo as MMPs -2 e -9 já foram descritas por Lana *et al.* (2000) em osteossarcoma canino, Leibman *et al.* (2000) em mastocitoma cutâneo canino, Papparella *et al.* (2002) em carcinomas mamários caninos, Loukopoulos *et al.* (2003) em diversos tumores canino e Mandara *et al.* (2009) em meningioma canino e felino.

O emprego de marcadores biológicos como a E-caderina, molécula de adesão intercelular epitelial associada à progressão e diferenciação celular, o gene de supressão tumoral p53, marcador envolvido com o ciclo celular e responsável

pela formação da maioria dos cânceres humanos e as metaloproteinases -2 e -9, marcadores envolvidos como o processo de invasão e metástase, permitem que maiores informações sobre o mecanismo biológico e sobre o comportamento clínico das neoplasias sejam obtidas, posto que as alterações determinantes da progressão de qualquer carcinogênese são resultado de numerosos eventos celulares que ocorrem a nível genético e bioquímico.

O objetivo com este trabalho foi caracterizar os parâmetros morfológicos encontrados no Carcinoma de Células Escamosas em cães, a fim de determinar o grau de malignidade e avaliar a expressão das proteínas p53, e-caderina e MMP-2 e -9.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS E SELEÇÃO

As amostras de tumores foram obtidas de levantamento no banco de dados, laminário e blocos do Laboratório de Patologia Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, abrangendo o período de 1996 a 2009. As amostras selecionadas foram catalogadas de acordo com a idade, sexo, raça e a localização da neoplasia, para posterior análise descritiva.

Foram incluídas neste estudo somente as amostras de cães que possuíam lâmina e bloco correspondente.

2.2 HISTOLOGIA

2.2.1 Processamento e avaliação histológica

Os tumores estudados estavam emblocados em parafina e foram reprocessados de acordo com o procedimento de rotina para histopatologia. Cortes de 3 μ m foram corados com as técnicas de Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Mallory, Tricrômico de Shorr e Azul de Toluidina.

Cada uma das amostras selecionadas foi submetida à avaliação histológica prévia para inclusão no estudo, sendo a seguir analisada e graduada de acordo com a classificação da OMS (WEISS; FREZE, 1974).

Os parâmetros avaliados foram: presença de cordões ou fileiras, presença de população densa de células neoplásicas, presença de pontes intercelulares, presença de “pérolas de queratina” sob objetiva de 10x, pleomorfismo nuclear sob objetiva de 40x, número de mitoses sob objetiva de 40x, tipo de infiltrado inflamatório, estágio de invasão, presença de estroma e presença de metaplasia.

Para quantificar o pleomorfismo nuclear e celular, o critério foi o mesmo utilizado por Bryne *et al.* (1989): pouco pleomorfismo nuclear representa mais de 75% de células maduras; moderado pleomorfismo nuclear representa de 50 a 75% de células maduras; e alto pleomorfismo celular representa de 25 a 50% de células maduras. Para o número de pérolas de queratina e número de mitoses, o critério utilizado foi o mesmo de Anneroth e Hansen (1984): pouco, variando de zero a dois; moderado, variando de três a quatro; e numerosas, cinco ou mais.

2.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A imunoistoquímica foi realizada no laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

2.3.1 Processamento das amostras para imunoistoquímica

A imunoexpressão das proteínas p53, e-caderina e MMP-2 e -9 foram obtidas através do método imunoenzimático da streptoavidina-biotina-peroxidase. Este consiste nas seguintes etapas: inicialmente foram obtidos cortes histológicos de 4 µm do material embocado em parafina, estendidos sobre lâminas previamente limpas, desidratadas e eletricamente carregadas. Em seguida, este material foi colocado em estufa a 60°C pelo período noturno para desfragmentação da parafina. O próximo passo foi a desparafinização da lâmina com dois banhos de xilol com duração de dez minutos cada. Seguiu-se com a desidratação do material com etanol absoluto e banho de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio e metanol 5% para o bloqueio da peroxidase endógena e lavagem em água destilada.

A próxima etapa foi a de recuperação antigênica. Para a recuperação do antígeno contido no tecido e quebra das ligações cruzadas provocadas pelo formol, os cortes foram submetidos à solução de Recuperador Imuno Retriever (DAKO®) em

banho-maria por 30 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada.

Para que não ocorressem alterações significativas de pH, os cortes foram submetidos à rápida incubação em solução tampão TRIS na concentração de 0,05 M e pH 7,4. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário contra a p53, a e-caderina e MMP-2 e -9 durante 18 horas (overnight) a 4°C, em câmara úmida, em solução tampão, pH 7,4. A diluição dos anticorpos foi estabelecida previamente pela titulação do anticorpo primário, chegando às diluições p53→1:200, e-caderina→1:100 e MMP-9 →1:50. A MMP-2 é apresentada na sua forma pré-diluída. Para a incubação do anticorpo secundário e complexo terciário (streptoavidina-biotina com peroxidase) utilizou-se o “Advanced[®]” (DAKO[®]). Para revelar a reação antígeno-anticorpo, as lâminas foram incubadas em cromógeno 3,3-diaminobenzidina (diaminobenzidina DAB[®], DAKO[®]) em 1ml de solução tampão, pH 7,4. Após a incubação, as lâminas foram submersas em solução tampão novamente, seguidas de lavagem em água corrente e água destilada.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris durante cinco minutos e lavados brevemente em água corrente e água destilada. As lâminas seguiram para desidratação em bateria ascendente de etanol durante cinco minutos cada (95% por três vezes e absoluto), seguida de diafanização em xilol e montagem com lâmina para análise em microscópio de luz.

2.3.2 Anticorpos

Os anticorpos utilizados foram o p53 (“anti-mouse”, monoclonal, DAKO[®]), e-caderina (“anti-mouse”, monoclonal, NOVOCASTRA[®]) e MMP-2 (“anti-rabbit”, monoclonal, SPRING-BIOSCIENCE[®]) e MMP-9 (“anti-mouse”, monoclonal, SPRING-BIOSCIENCE[®]).

2.3.3 Análise quantitativa da expressão da p53, e-caderina e MMP-2 e-9

Foram selecionados cortes histológicos para o estudo imunoistoquímico a partir de preparações coradas pela HE, representativos da neoplasia e sem artefatos técnicos. Cortes com extensas áreas de necrose foram descartados devido a possíveis vieses de aferição na avaliação imunoistoquímica.

A análise das células imunopositivas para os anticorpos contra p53, e-caderina e MMP-2 e -9 foi realizada com duas repetições em campos definidos e escolhidos aleatoriamente, sendo consideradas positivas somente marcações em núcleos e citoplasma, de coloração castanha, independente da intensidade da coloração, com suficiência para diferenciação entre positivo e negativo.

As imagens de cada campo foram obtidas em microscópio, com aumento de 400 vezes, sendo, a seguir, transferidas para um monitor acoplado a um sistema computadorizado, onde foram quantificados os núcleos que expressavam imunomarcação.

A imunorreatividade foi dividida conforme o número de células imunomarcadas em um total de 1000 células contadas em campos com 400 aumentos.

Em relação à p53, a quantificação imunoistoquímica é obtida com a razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total de células tumorais, sendo aplicado o seguinte esquema: (0) < 1% de células marcadas; (1) 1-10% de células marcadas; (2) 11-50% de células marcadas e; (3) > 50% das células marcadas (IGGO *et al.*, 1990).

Quanto à avaliação da e-caderina as lâminas são avaliadas de acordo com a presença ou ausência de expressão. Analisando o padrão e intensidade de marcação da expressão da e-caderina, as amostras são classificadas em quatro escores: (1) ausente; (2) heterogêneo focal; (3) homogêneo reduzido e (4) homogêneo forte. A percentagem de células tumorais positivas para a e-caderina com expressão em membrana são classificadas também em quatro escores: (1) < 25%; (2) 26-50%; (3) 51-75%; (4) >76% (LYAKHOVITSKY *et al.*, 2004).

Para a MMP-2 e -9 a leitura das lâminas foi realizada sob microscopia óptica com aumento de 200 e 400 vezes. Observou-se a presença ou não de MMP-2 e -9 nas amostras de carcinomas de células escamosas por meio da intensidade e da coloração. O resultado foi expresso em: (0), (+), (++) e (+++), de acordo com a quantidade de MMP-2 e -9 e coloração encontradas (ausente, bege, castanho e castanho-escuro, respectivamente) (MORALES *et al.*, 2007).

3 RESULTADOS

3.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Dentre o total de 3.686 amostras de tumores obtidas ao longo do período de 1996 e 2009, 63 (1,7%) eram de Carcinoma de Células Escamosas. Das 63 amostras de CCE, 27 (43%) eram de cães, sendo que as demais 38 amostras (57%) representavam CCE nas demais espécies como felinos, eqüinos, bovinos e ovinos (Figura 1).

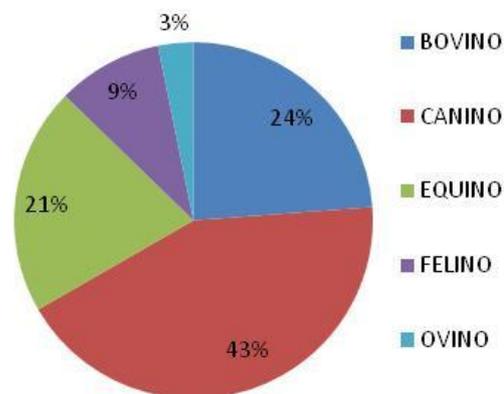


Figura 1: Percentagem, por espécie animal, de 63 amostras de CCE do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Dentre as 27 amostras de cães, somente 13 foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão mencionados, ou seja, possuir lâmina e bloco correspondente.

3.2 IDADE

A ocorrência de carcinoma de células escamosas de acordo com a idade, dos 13 animais estudados, variou de dois a 13 anos, sendo que a média de idade foi de 6,4 anos. Dois destes animais estudados não tinham dados sobre a idade exata, somente que eram adultos (Figura 2).

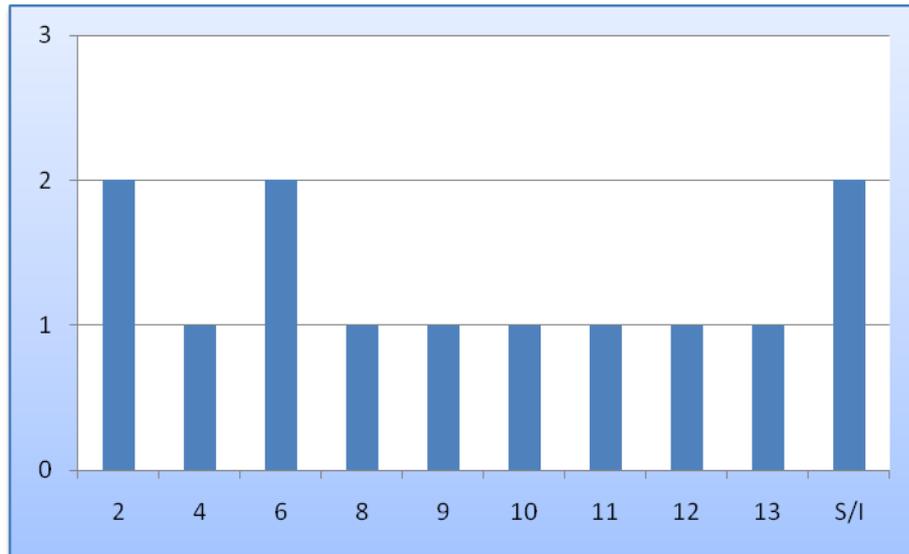


Figura 2: Número de casos de CCE por idade dos animais acometidos, dentro das 13 amostras selecionadas por meio de levantamento de dados do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR abrangendo o período de 1996 a 2009.

3.3 RAÇAS E SEXO

Verificou-se maior incidência de carcinoma de células escamosas em cães sem raça definida (46,15%), seguido por cães da raça Boxer (23,08%), Fox terrier, Rotweiller, Husky Siberiano e Fila Brasileiro (7,69% cada) (Figura 3). Quanto ao sexo dos animais, as fêmeas (62%) foram mais acometidas com CCE que os machos (38%).

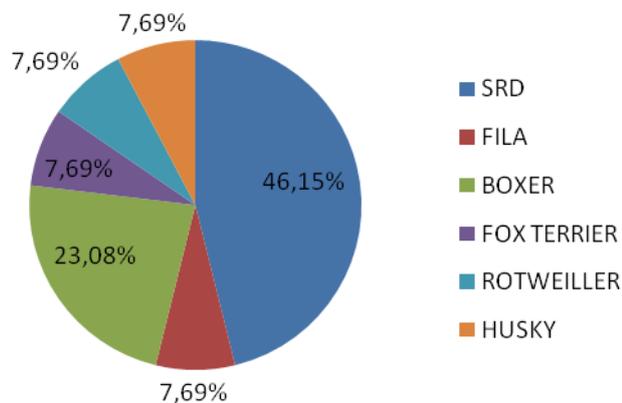


Figura 3: Percentagem de cães com CCE conforme a raça, dentro das 13 amostras do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

3.4 LOCALIZAÇÃO DA NEOPLASIA

Observou-se que o local de maior incidência do CCE em cães foi à região do abdômen (46,15%), incluindo a pele da região em volta da glândula mamária, seguido da bolsa escrotal e membro pélvico (15,38% cada), pálpebra, pele da região cervical e leito ungueal do 3º dígito (7,69% cada) (Figura 4).

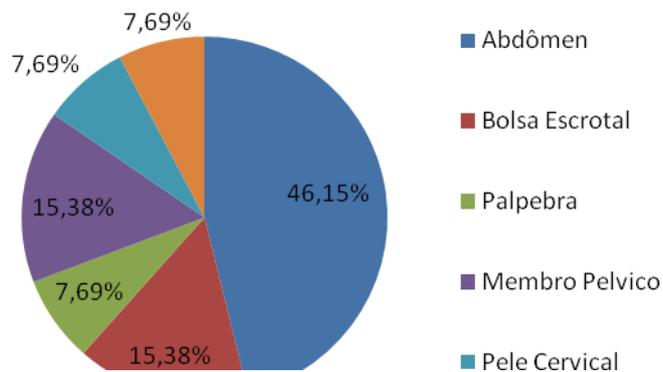


Figura 4: Percentagem de cães com CCE conforme a localização da neoplasia das 13 amostras do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

3.5 HISTOPATOLOGIA

Dos 13 cães com CCE, cinco (38,5%) foram classificados como bem diferenciados, cinco (38,5%) como moderadamente diferenciados e três (23%) como pouco diferenciados.

Os parâmetros mais importantes na classificação foram o pleomorfismo nuclear, pérolas de queratina, pontes intercelulares e número de mitoses (Quadro 1).

Quadro 1 – Parâmetros utilizados para a classificação do CCE de cães de 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Amostras	Pleomorfismo Nuclear ¹	Número de Mitoses ¹	Pérolas de Queratina ²	Pontes Intercelulares ¹	Classificação
461	Pouco	Pouco	Pouco	Pouco Evidente	Bem Diferenciado
2028	Pouco	Moderado	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
675	Pouco	Pouco	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
3113	Pouco	Pouco	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
576	Pouco	Pouco	Moderado	Pouco Evidente	Bem Diferenciado
3620	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
1939	Moderado	Moderado	Moderado	Pouco Evidente	Mod. Diferenciado
3465	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
444	Moderado	Moderado	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
928	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
107	Pouco	Pouco	Ausente	Não Evidente	Pouco Diferenciado
861	Alto	Numerosas	Numerosas	Evidente	Pouco Diferenciado
318	Alto	Moderado	Pouco	Pouco Evidente	Pouco Diferenciado

Legenda: ¹ Objetiva de 40x, ² Objetiva de 10x. Pouco (0-2), Moderado (3-5) e Numerosas (>5).

Em 92,3% das amostras, o parâmetro morfológico pleomorfismo nuclear e celular apresentou-se em conformidade com a classificação estabelecida pela OMS. Quando o pleomorfismo nuclear foi reduzido, o tumor foi classificado como bem diferenciado; quando o pleomorfismo era moderado, o tumor foi classificado como moderadamente diferenciado; e, quando o pleomorfismo foi alto, o tumor foi classificado como pouco diferenciado. Somente uma das amostras (7,7%), onde o pleomorfismo nuclear foi considerado reduzido, foi classificada como carcinoma pouco diferenciado.

De acordo com o parâmetro número de mitoses, 54% das amostras estavam em conformidade com o descrito pela OMS e 46% dos resultados encontrados divergiram entre os grupos classificados. Das seis amostras que divergiram, somente uma apresentou diferença importante, pois havia menos de duas mitoses por campo quando deveria apresentar mais de cinco.

Em relação ao parâmetro morfológico presença de pérolas de queratina, 23% das amostras analisadas apresentaram divergências quando classificadas de acordo com OMS: nos tumores bem diferenciados, onde deveria haver numerosas pérolas de queratina, duas amostras variaram de pouco a moderada presença e, nos tumores pouco diferenciados, uma amostra apresentou numerosas pérolas de queratina. Quanto à presença de pontes intercelulares, estas estão relacionadas com a presença de pérolas de queratina, ou seja, quando esta se encontra em maior

número, a presença de pontes intercelulares é mais evidente e quando o número de pérolas é reduzido ou ausente, as pontes intercelulares não são evidentes, tornando-se aparentes e, em alguns casos, encontram-se ausentes.

Em relação aos demais parâmetros morfológicos analisados, estes foram considerados secundários e somente serviram de auxílio para a interpretação da classificação (Quadro 2).

Quadro 2 – Parâmetros morfológicos secundários para a caracterização do CCE de cães de 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Amostras	Estroma	Cordões/Fileiras	População Densa	Estágio de Invasão	Metaplasia	Infiltrado Inflamatório	Classificação
461	Sim	Não	Não	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Bem Diferenciado
2028	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Misto (Linf. + Neutrof.)	Bem Diferenciado
675	Sim	Não	Não	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Bem Diferenciado
3113	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Bem Diferenciado
576	Sim	Não	Sim	Derme Reticular	Não	Misto (Linf. + Neutrof.)	Bem Diferenciado
3620	Sim	Não	Sim	Derme Reticular	Não	Linfoplasmocitário	Mod. Diferenciado
1939	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Mod. Diferenciado
3465	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Mod. Diferenciado
444	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Neutrofilico	Mod. Diferenciado
928	Sim	Não	Sim	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Mod. Diferenciado
107	Não	Não	Não	Derme Reticular	Não	Ausente	Pouco Diferenciado
861	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Neutrofilico	Pouco Diferenciado
318	Sim	Sim	Sim	Derme Profunda	Não	Linfoplasmocitário	Pouco Diferenciado

Os cinco tumores classificados como bem diferenciados (Quadro 3) foram classificados principalmente por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear reduzido (Figura 5), (2) número de mitoses reduzido (Figura 5) e (3) presença de pérolas de queratina (Figura 6) com pontes intercelulares evidentes. Dentre as amostras analisadas, a principal divergência foi no número de pérolas de queratina, que deveriam ser numerosas, mas que em dois casos estavam como poucas ou moderadas. Em relação aos demais parâmetros (quadro 2), três tumores apresentaram infiltrados inflamatórios linfoplasmocitário na periferia do tumor e dois apresentaram infiltrados misto (linfoplasmocitário e neutrofilico. Todos os tumores apresentaram estroma e somente em dois a presença de cordões/fileiras foi detectada. Em relação ao estágio de invasão, quatro amostras invadiram a derme profunda e uma a derme reticular. Nenhuma das neoplasias apresentou metaplasia.

Quadro 3 – Grupo de cinco amostras de cães classificadas como CCE bem diferenciados a partir de 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Amostras	Pleomorfismo Nuclear ¹	Número de Mitoses ¹	Pérolas de Queratina ²	Pontes Intercelulares ¹	Classificação
461	Pouco	Pouco	Pouco	Pouco Evidente	Bem Diferenciado
2028	Pouco	Moderado	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
675	Pouco	Pouco	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
3113	Pouco	Pouco	Numerosas	Evidente	Bem Diferenciado
576	Pouco	Pouco	Moderado	Pouco Evidente	Bem Diferenciado

Legenda: ¹ Objetiva de 40x, ² Objetiva de 10x. Pouco (0-2), Moderado (3-5) e Numerosas (>5).

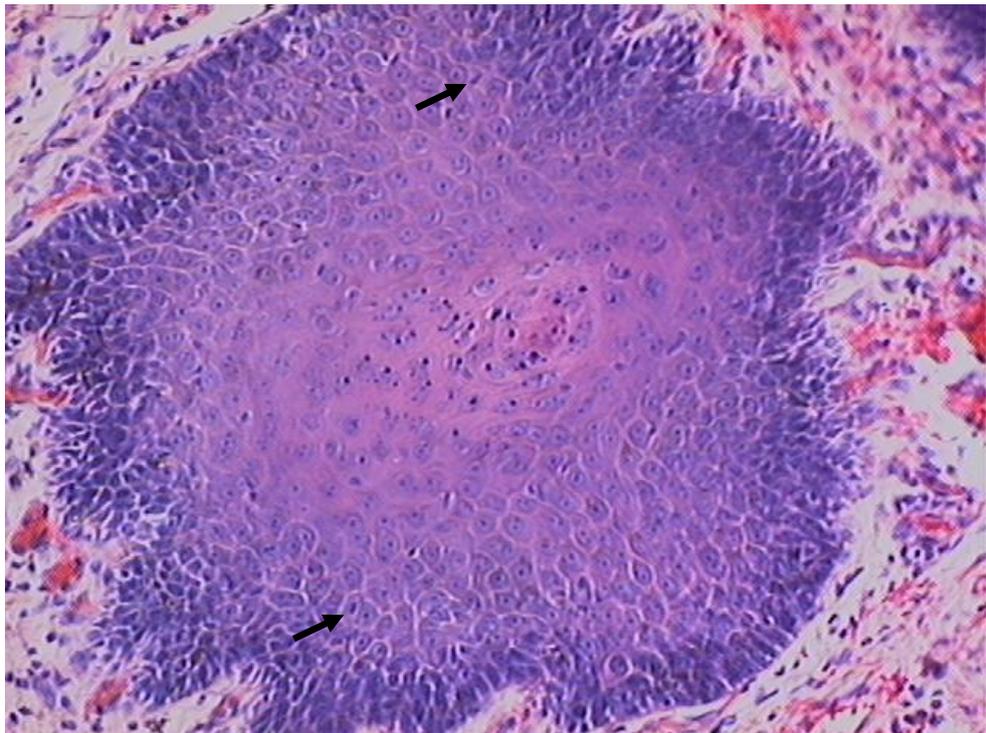


Figura 5: Cão. Pele. Microfotografia de CCE bem diferenciado. Área apresentando pouco pleomorfismo nuclear e celular e presença reduzida no número de mitoses (setas). HE. Obj. 10x.

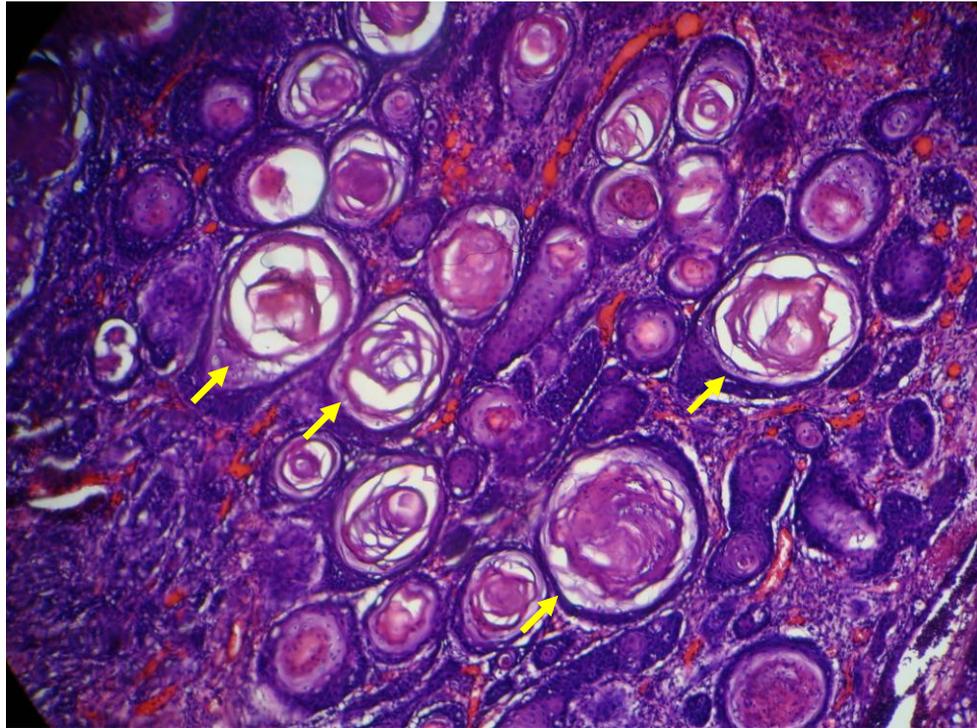


Figura 6: Cão. Pele. Microfotografia de CCE bem diferenciado. Presença de numerosas pérolas de queratina (setas). HE. Obj. 20x.

Os cinco tumores moderadamente diferenciados (Quadro 4) foram classificados por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear moderado (Figura 7), (2) números de mitose variando de pouco a moderado (Figura 7), (3) presença moderada de pérolas de queratina (Figura 8) e (4) pontes intercelulares aparentes. Em relação aos outros parâmetros (quadro 2), duas amostras não apresentaram cordões/fileiras; uma das amostras apresentou estágio de invasão no nível da derme reticular e outra apresentou estágio de invasão tão profundo que chegou a invadir a camada óssea. Nenhuma das amostras evidenciou a presença de metaplasia. Este grupo foi o único que não apresentou divergências dentro dos parâmetros principais.

Quadro 4 – Grupo de cinco amostras de cães classificadas como CCE moderadamente diferenciados a partir de 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Amostras	Pleomorfismo Nuclear ¹	Número de Mitoses ¹	Pérolas de Queratina ²	Pontes Intercelulares ¹	Classificação
3620	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
1939	Moderado	Moderado	Moderado	Pouco Evidente	Mod. Diferenciado
3465	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
444	Moderado	Moderado	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado
928	Moderado	Pouco	Moderado	Evidente	Mod. Diferenciado

Legenda: ¹ Objetiva de 40x, ² Objetiva de 10x. Pouco (0-2), Moderado (3-5) e Numerosas (>5).

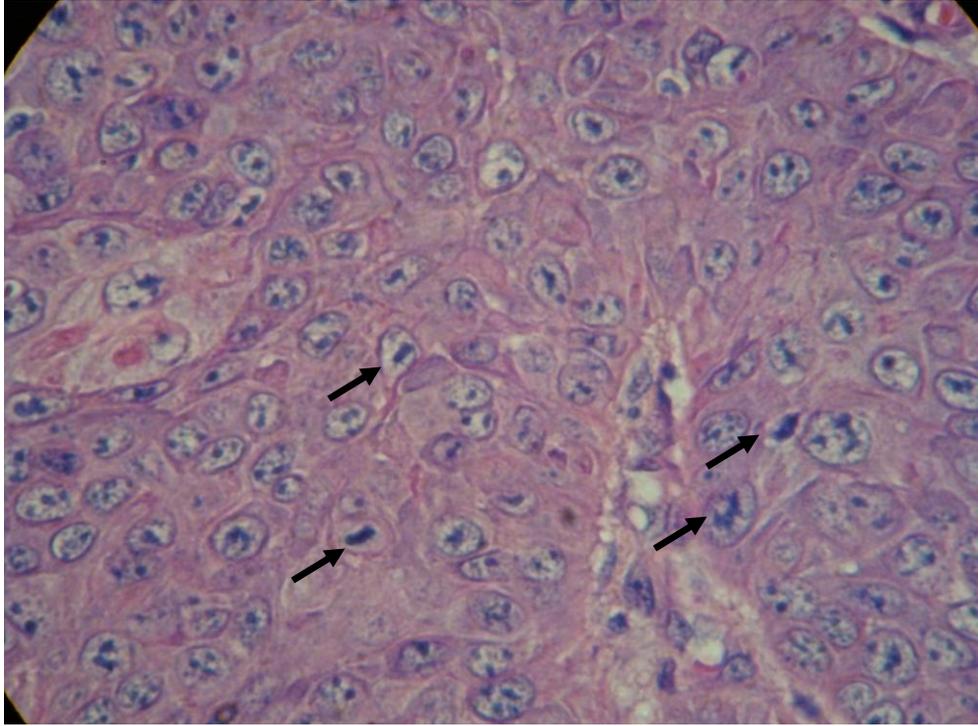


Figura 7: Cão. Pele. Microfotografia de CCE moderadamente diferenciado. Área apresentando pleomorfismo celular e nuclear moderado e número de mitoses (setas) moderado. HE. Obj. 40x.

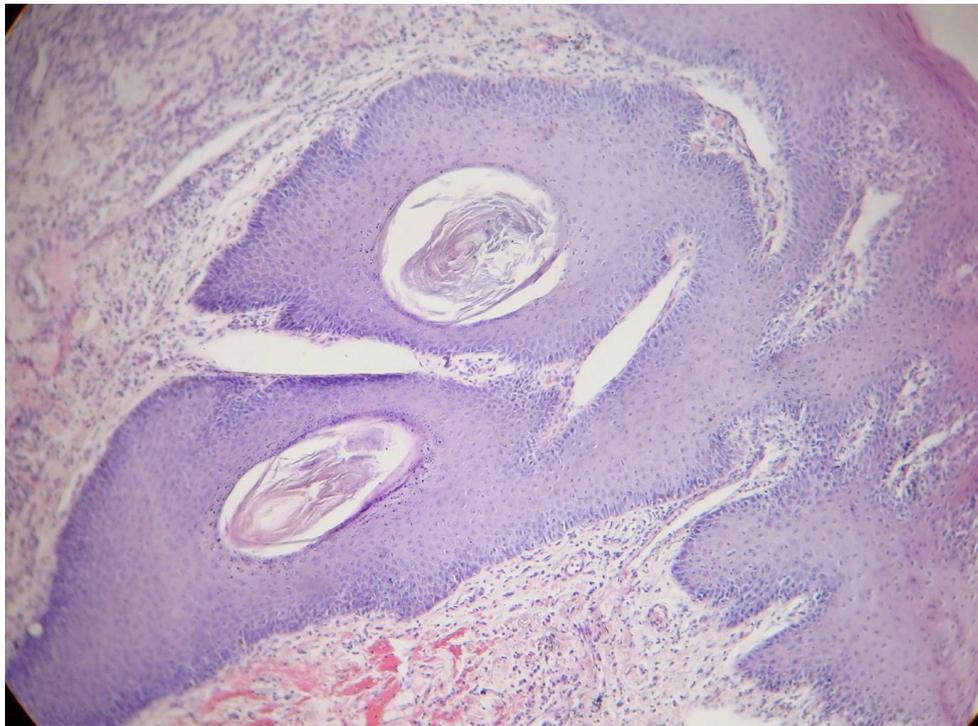


Figura 8: Cão. Pele. Microfotografia de CCE moderadamente diferenciado. Presença moderada de pérolas de queratina (centro). HE. Obj. 10x.

Dos três tumores classificados como pouco diferenciados (quadro 5), dois foram classificados por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear pronunciado (Figura 9) e (2) número de mitoses variando de moderado a alto, com presença de mitoses atípicas (Figura 10). Pontes intercelulares evidentes e presença de pérolas de queratina variando de pouco a numerosas também foram observados, divergindo, portanto, da classificação proposta pela OMS. Em relação aos demais parâmetros (quadro 2), as duas amostras caracterizadas como pouco diferenciadas, neste estudo, apresentaram estroma, cordões/fileiras, população densa, ausência de metaplasia e invasão da derme profunda. Quanto ao tipo de infiltrado inflamatório, uma amostra apresentou infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e a outra infiltrado neutrofílico. O outro tumor classificado como pouco diferenciado foi classificado por não apresentar pérolas de queratina (Figura 11) e pontes intercelulares, apesar de divergir no pleomorfismo nuclear e celular e número de mitoses. Em relação aos outros parâmetros analisados este tumor não apresentou estroma, cordões/fileiras, população densa, metaplasia e infiltrado inflamatório. O estágio de invasão foi no nível da derme reticular.

Quadro 5 – Grupo de três amostras de cães classificadas como CCE pouco diferenciados a partir de 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996 a 2009.

Amostras	Pleomorfismo Nuclear ¹	Número de Mitoses ¹	Pérolas de Queratina ²	Pontes Intercelulares ¹	Classificação
107	Pouco	Pouco	Ausente	Não Evidente	Pouco Diferenciado
861	Alto	Numerosas	Numerosas	Evidente	Pouco Diferenciado
318	Alto	Moderado	Pouco	Pouco Evidente	Pouco Diferenciado

Legenda: ¹ Objetiva de 40x, ² Objetiva de 10x. Pouco (0-2), Moderado (3-5) e Numerosas (>5).

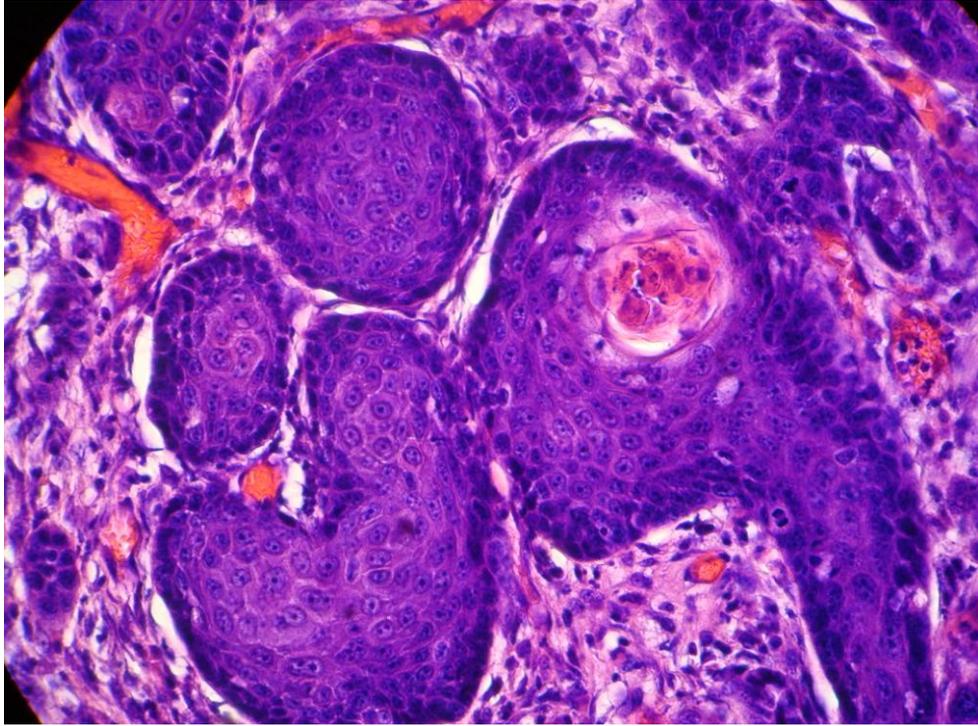


Figura 9: Cão. Pele. Microfotografia de CCE pouco diferenciado. Área apresentando alto pleomorfismo nuclear e celular. HE. Obj. 40x.

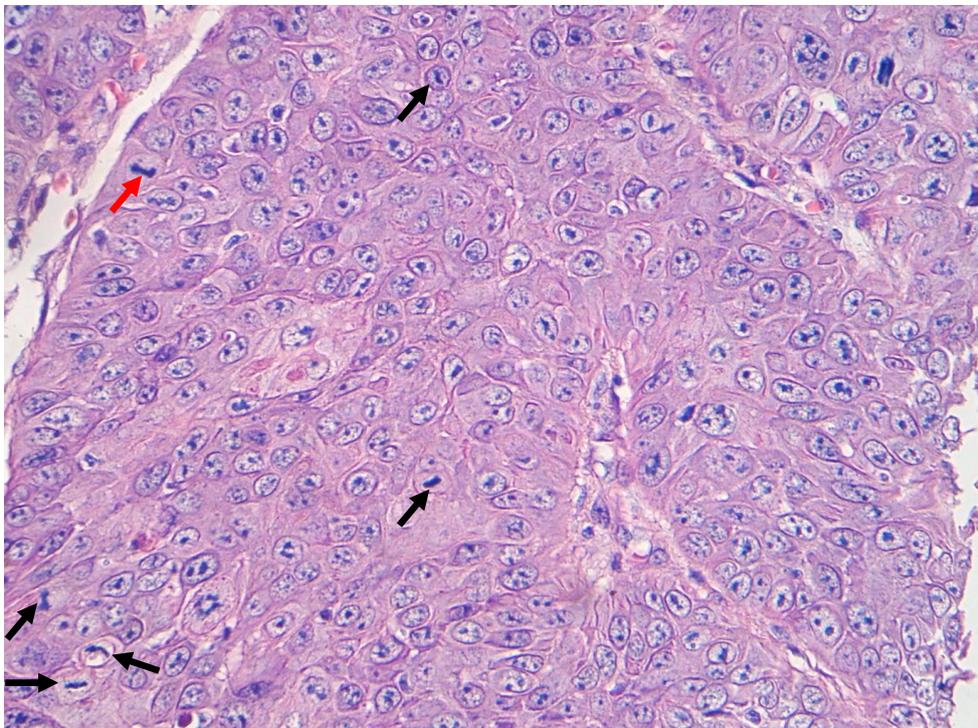


Figura 10: Cão. Pele. Microfotografia de CCE pouco diferenciado. Área apresentando alto pleomorfismo nuclear e celular e alto número de mitoses (setas pretas) incluindo mitoses atípicas (seta vermelha). HE. Obj. 20x.

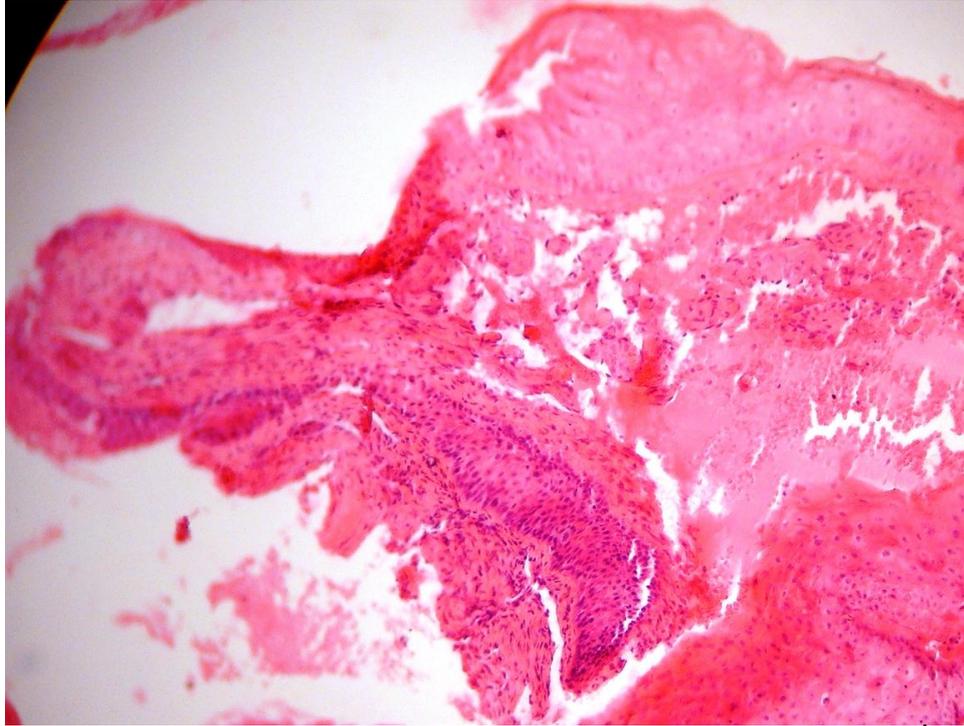


Figura 11: Cão. Pele. Microfotografia de CCE pouco diferenciado. Área apresentado ausência de pérolas de queratina. HE. Obj. 10x.

3.6 IMUNOISTOQUÍMICA

Das 13 amostras selecionadas para a avaliação histológica, somente sete foram processadas na análise imunoistoquímica, devido a quantidade de material existente nos blocos de parafina.

3.6.1 Análise imunoistoquímica da p53

Das sete amostras selecionadas, nenhuma delas apresentou expressão positiva para a p53 (Figura 12).

O controle positivo feito com tecido neoplásico humano apresentou a coloração castanha esperada para a expressão da p53 conforme pode ser observada na figura 13.

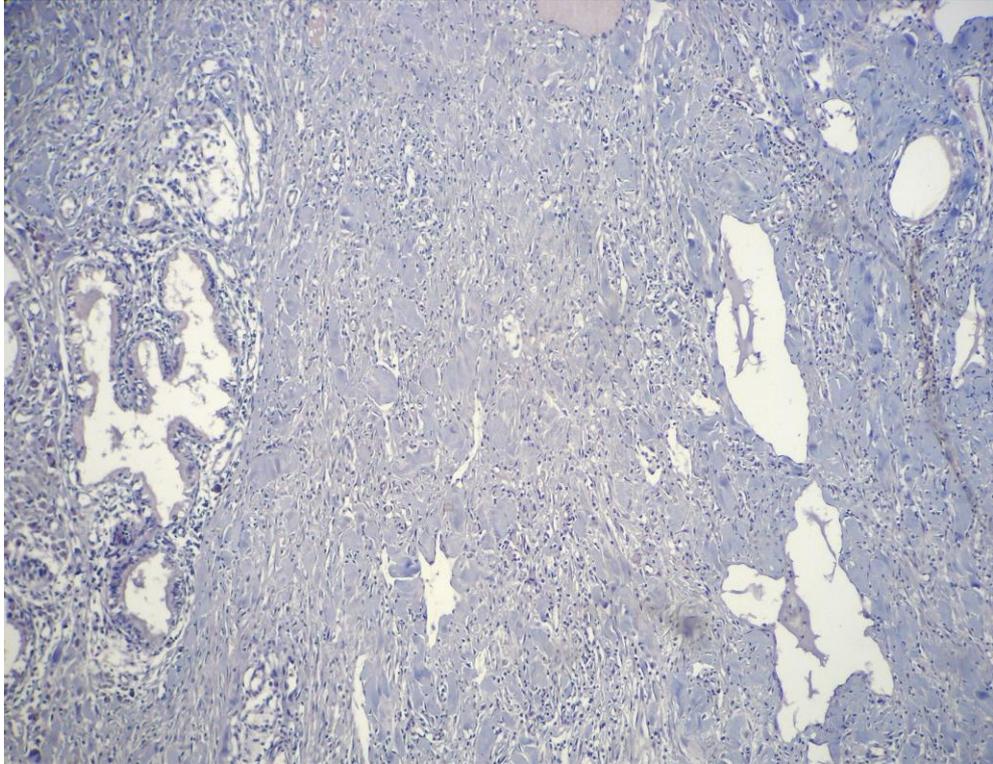


Figura 12: Cão. Pele. Microfotografia de Carcinoma de Células Escamosas. Imunoistoquímica para a p53. Marcação negativa ou ausente. Obj. 10x.

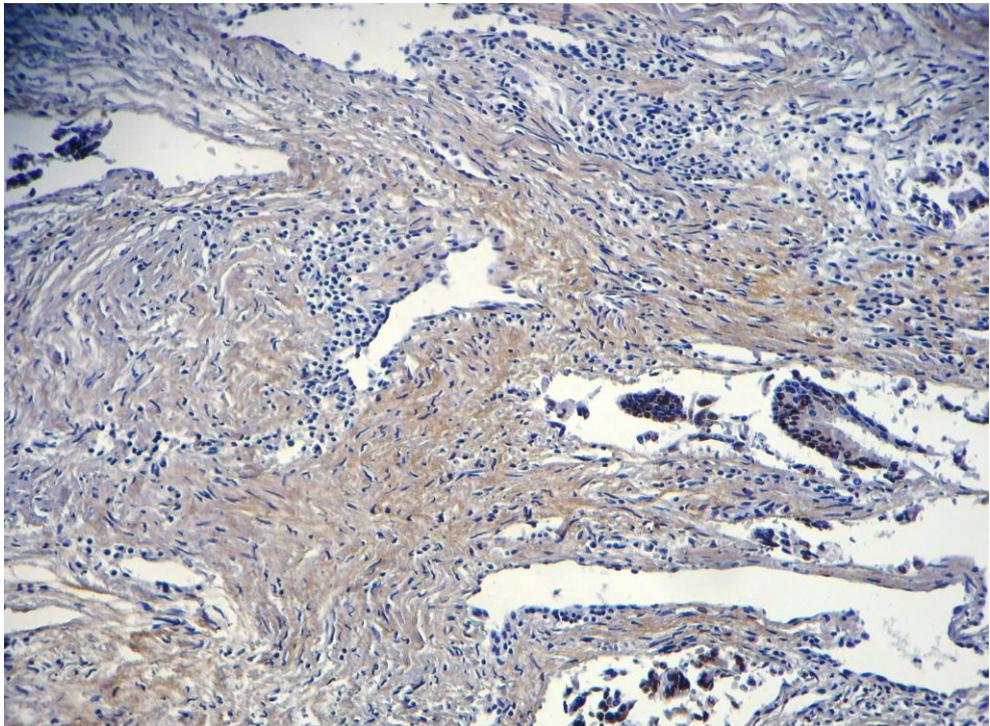


Figura 13: Humano. Tumor. Imunoistoquímica para a p53. Controle Positivo (coloração castanha). Obj. 10x.

3.6.2 Análise imunoistoquímica da e-caderina

Assim como a p53, não foi encontrada expressão positiva para a e-caderina nas sete amostras analisadas. Algumas das amostras apresentaram marcação fraca para e-caderina na pele normal (Figura 14), porém nenhuma na epiderme neoplásica (Figura 15). O controle positivo foi feito utilizando uma amostra de amígdala humana e apresenta coloração castanha (Figura 16).

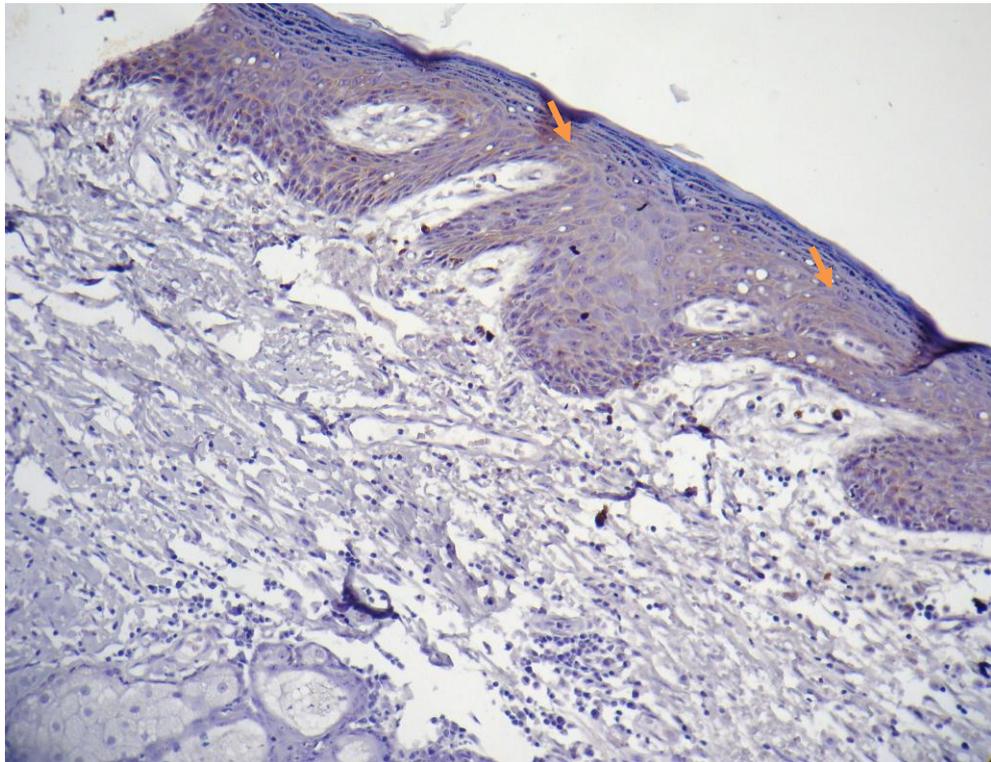


Figura 14: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para e-caderina. Marcação fraca (seta laranja) para e-caderina. Obj. 10x.

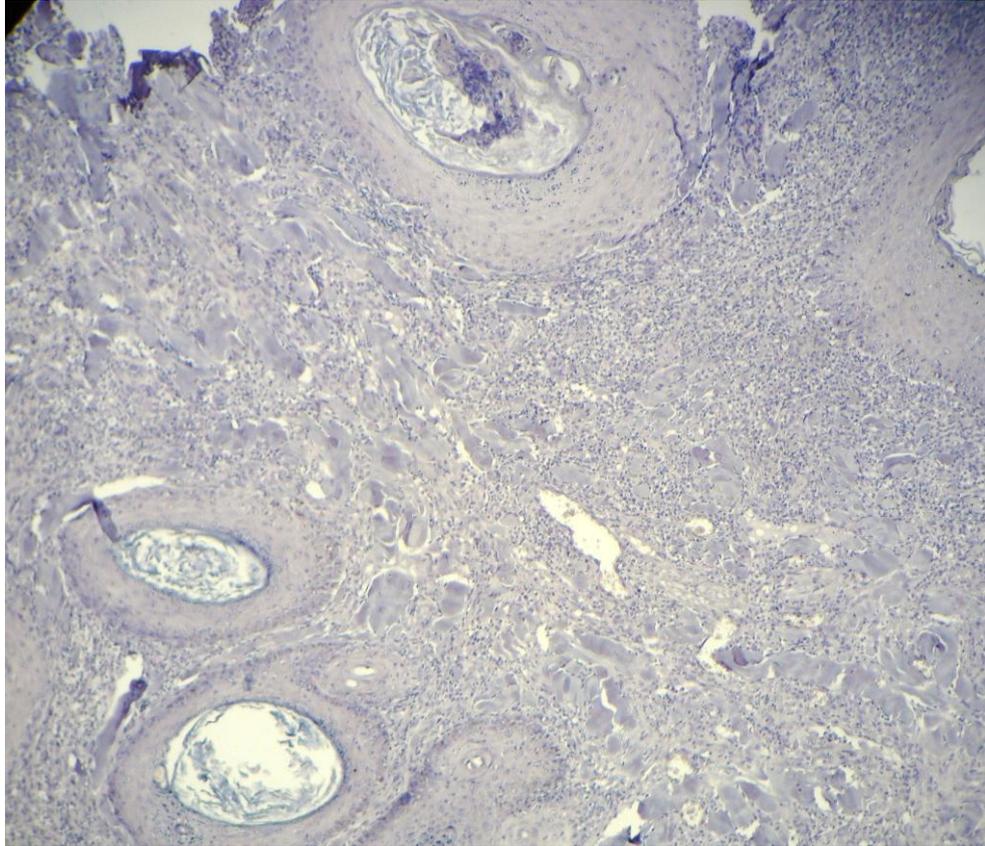


Figura 15: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para e-caderina. Marcação negativa. Obj. 20x.

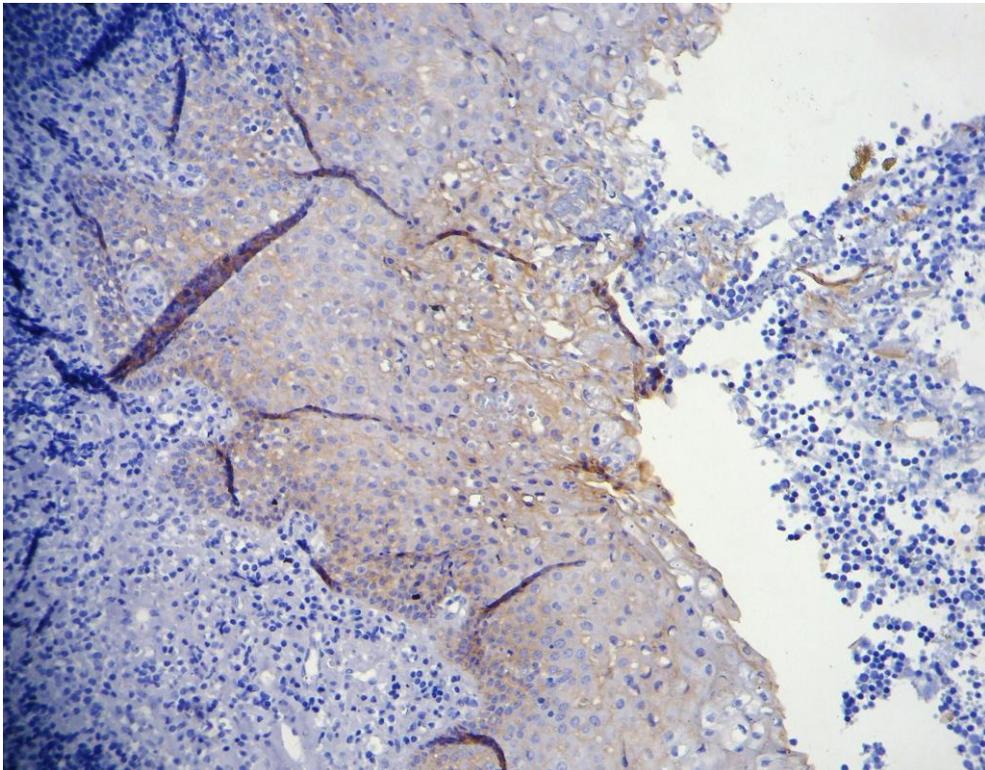


Figura 16: Humano. Amígdala. Imunoistoquímica para e-caderina. Controle Positivo (coloração castanha). Obj. 10x.

3.6.3 Análise imunoistoquímica da MMP-2 e -9

Nos carcinomas de células escamosas estudados, as metaloproteinases imunomarcadas foram evidenciadas, ao microscópio de luz, como uma pigmentação acastanhada. A positividade foi observada principalmente nas células tumorais, com marcação predominantemente citoplasmática e ocasionalmente nuclear.

A intensidade da pigmentação e a proporção de células expressando as metaloproteinases investigadas foram heterogêneas. Em alguns casos, extensas áreas da massa tumoral exibiram positividade, enquanto em outros, apenas alguns cordões celulares ou células neoplásicas dispersas se mostraram marcadas.

Foi observada marcação das metaloproteinases, com frequência variável, em fibras musculares, glândulas sebáceas e fibras colágenas (Figura 17). O epitélio adjacente ocasionalmente exibiu imunopositividade para as metaloproteinases estudadas.

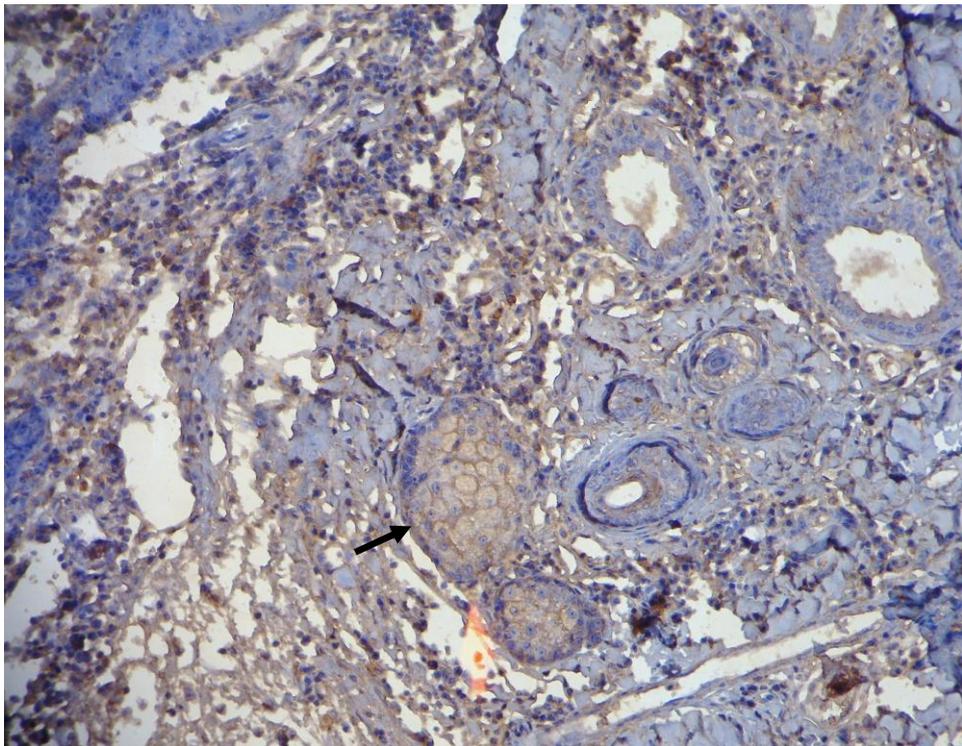


Figura 17: Cão. Pele. Microfotografia de epiderme não neoplásica. Imunoistoquímica para MMP-2. . Marcação (0) ou ausente. Presença de marcação positiva para a glândula sebácea (seta).Obj. 20x

Das sete amostras analisadas, em quatro (57,1%) foi detectada a expressão da MMP-2 e em três (42,9%) não foi detectada a expressão da MMP-2. Dentro das quatro amostras consideradas positivas para a MMP-2, o grau de expressão variou de fraca (+) a forte (+++). Os resultados encontrados estão demonstrados nas figuras 18 a 21.

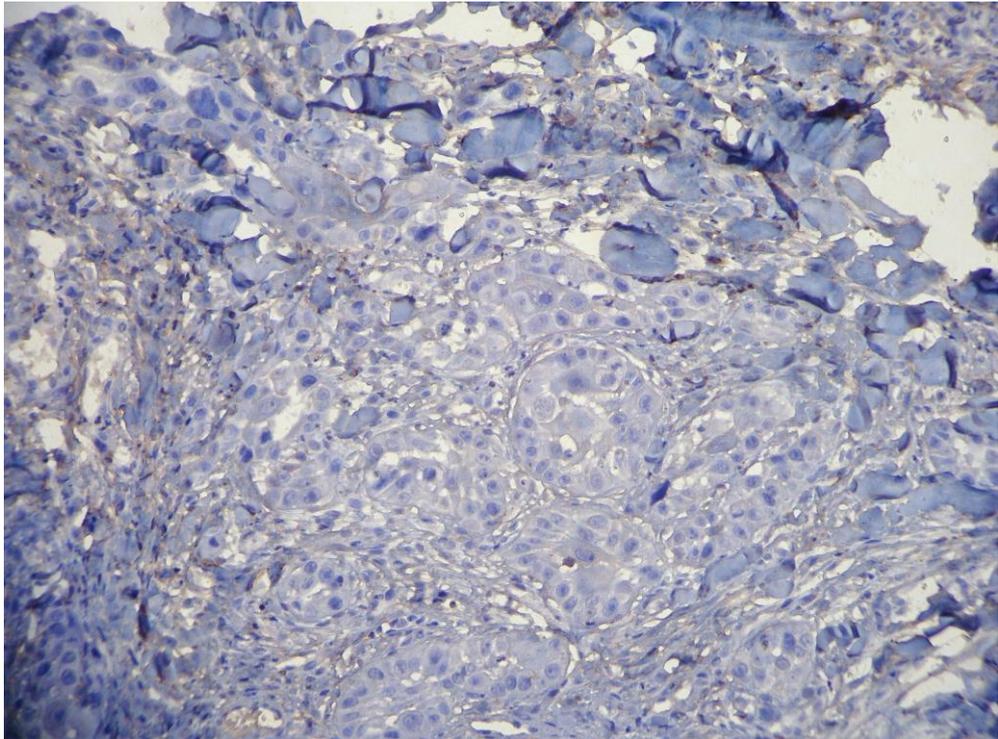


Figura 18: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-2. Marcação (0) ou Negativa. Obj. 20x

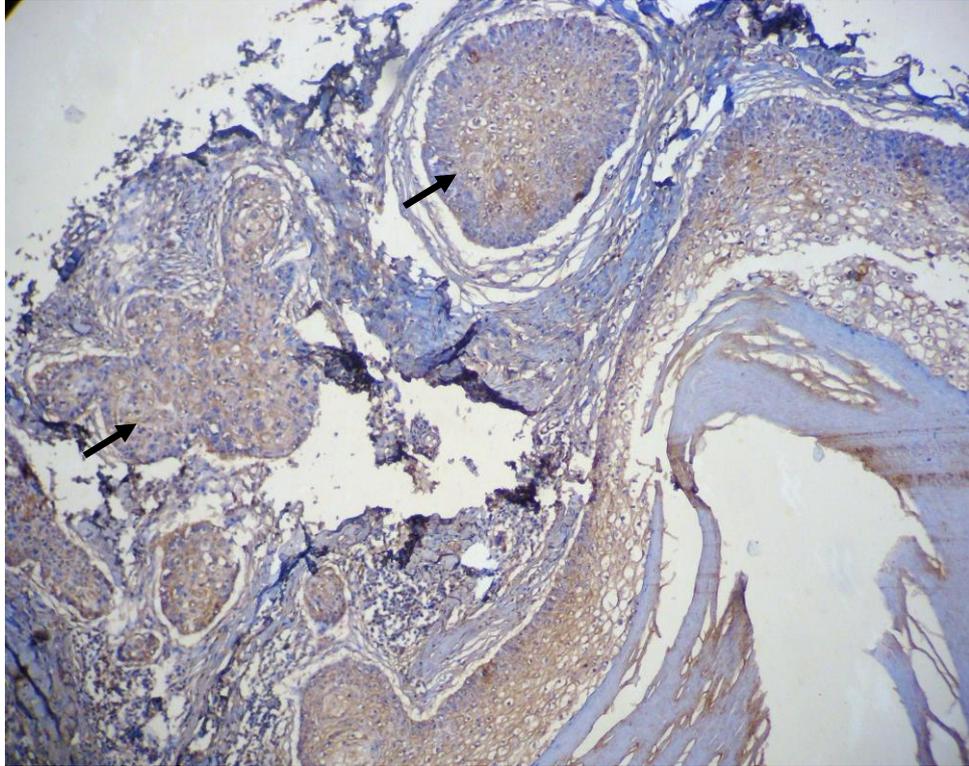


Figura 19: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-2. Marcação + ou fraca (coloração bege) (setas). Obj. 10x.

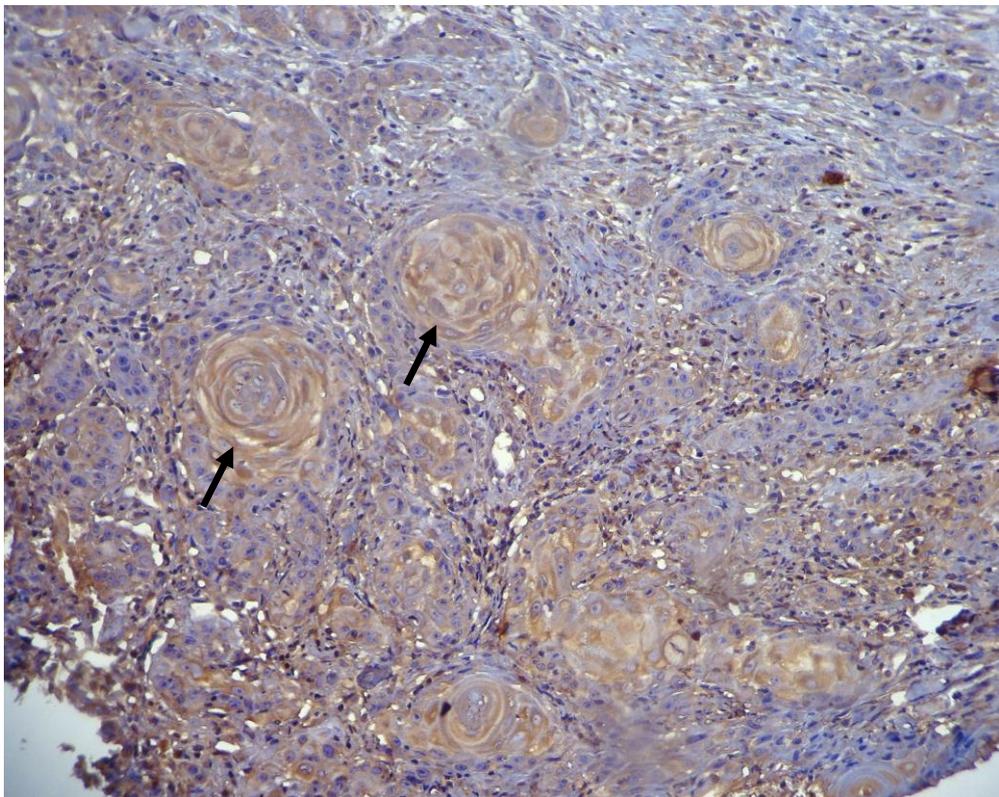


Figura 20: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-2. Marcação (++) ou moderada (coloração castanha) (setas). Obj 20x.

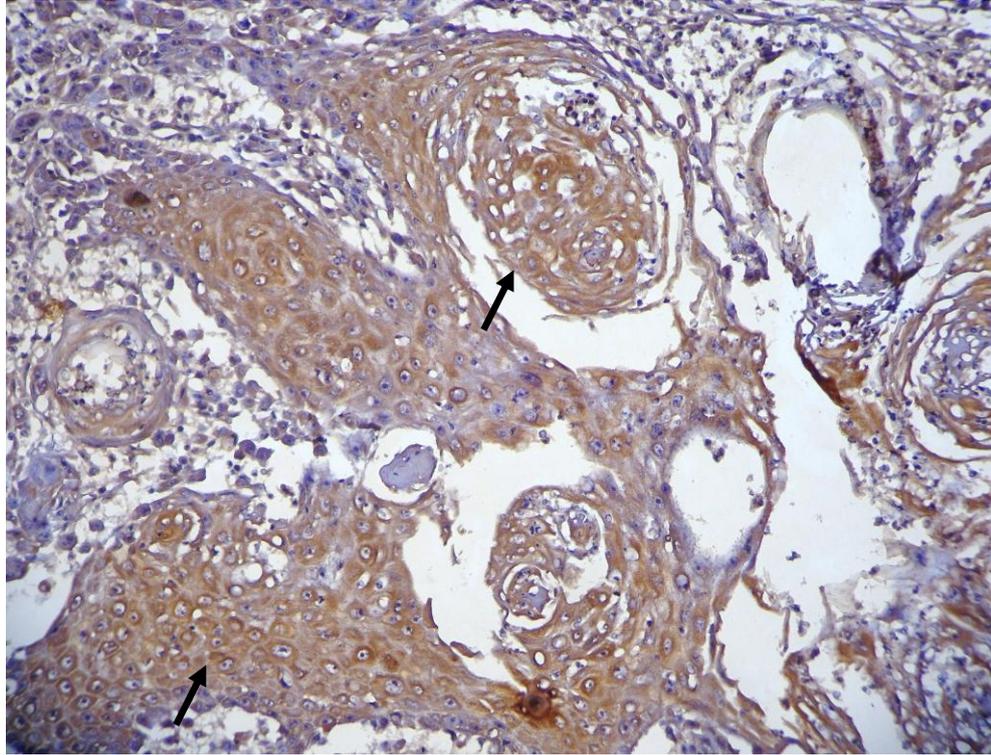


Figura 21: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-2. Marcação (+++) ou forte (coloração castanha escura) (setas). Obj. 10x.

Com relação a expressão da MMP-9, das sete amostras analisadas, quatro (57,1%) foram consideradas positivas e três (42,9%) negativas. Das quatro amostras positivas a intensidade variou de fraco (+) a forte (+++). Os resultados das amostras estão demonstrados nas figuras 22 a 25.

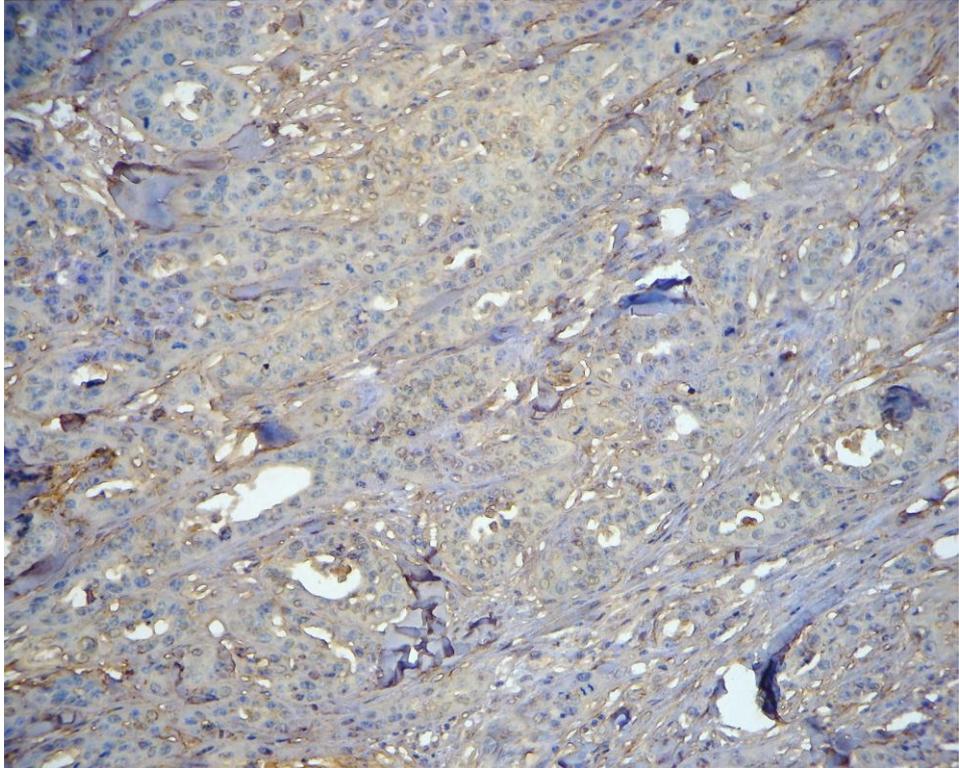


Figura 22: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-9. Marcação (0) ou negativa. Obj. 10x.

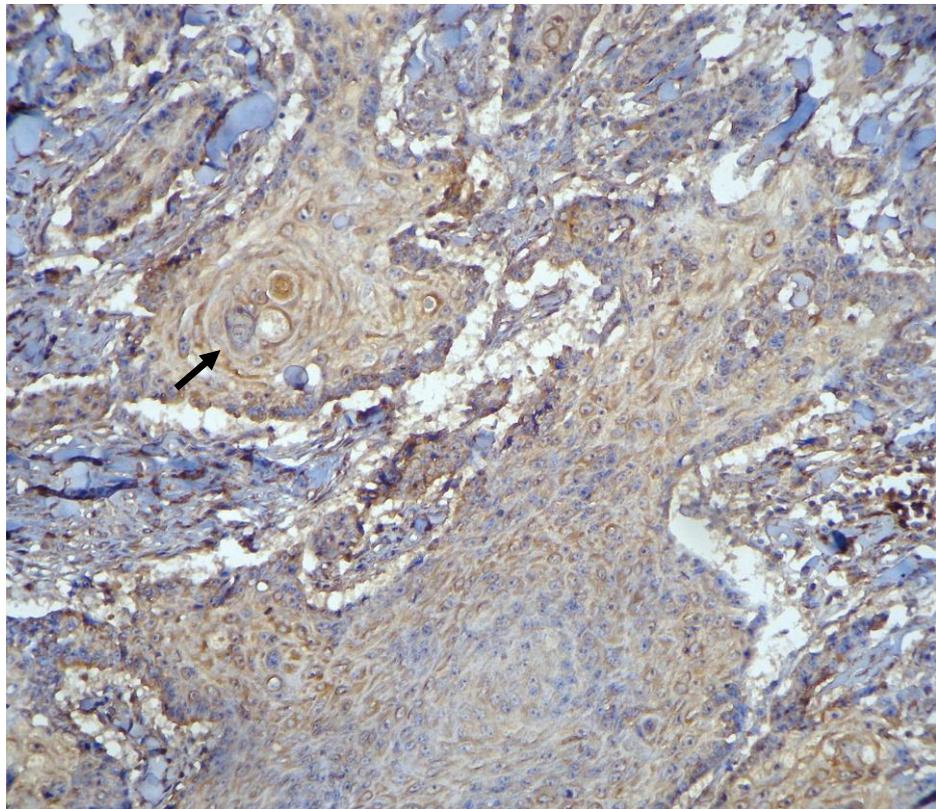


Figura 23: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunohistoquímica para MMP-9. Marcação (+) ou fraca (coloração bege) (seta). Obj. 20x.

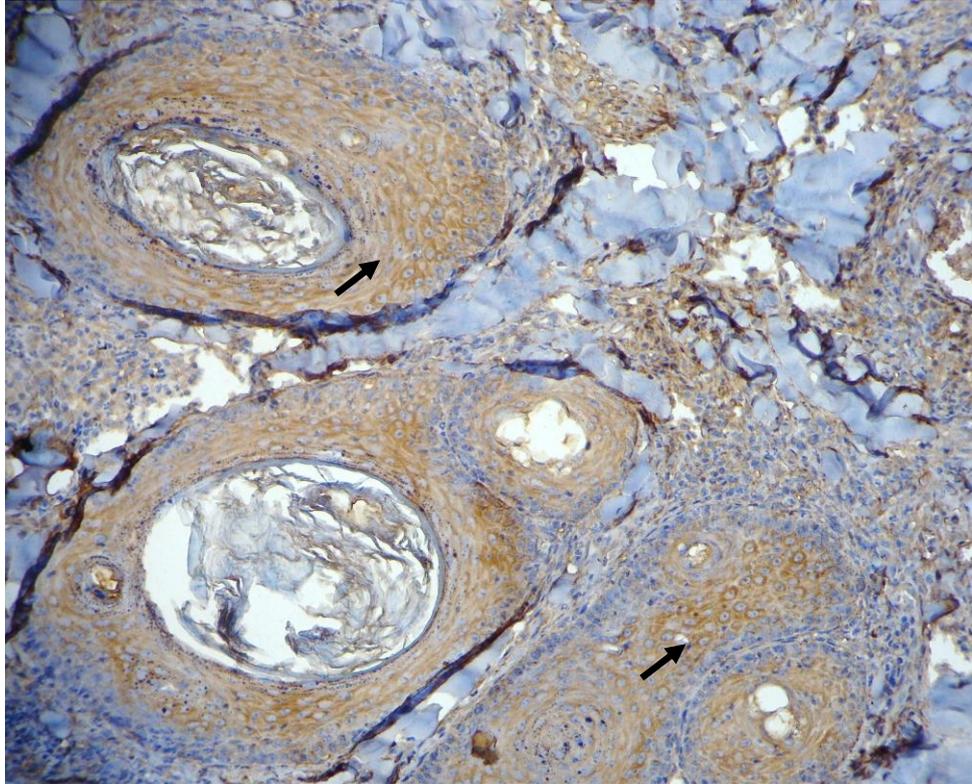


Figura 24: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-9. Marcação (++) ou moderada (coloração castanha) (setas). Obj. 20x.

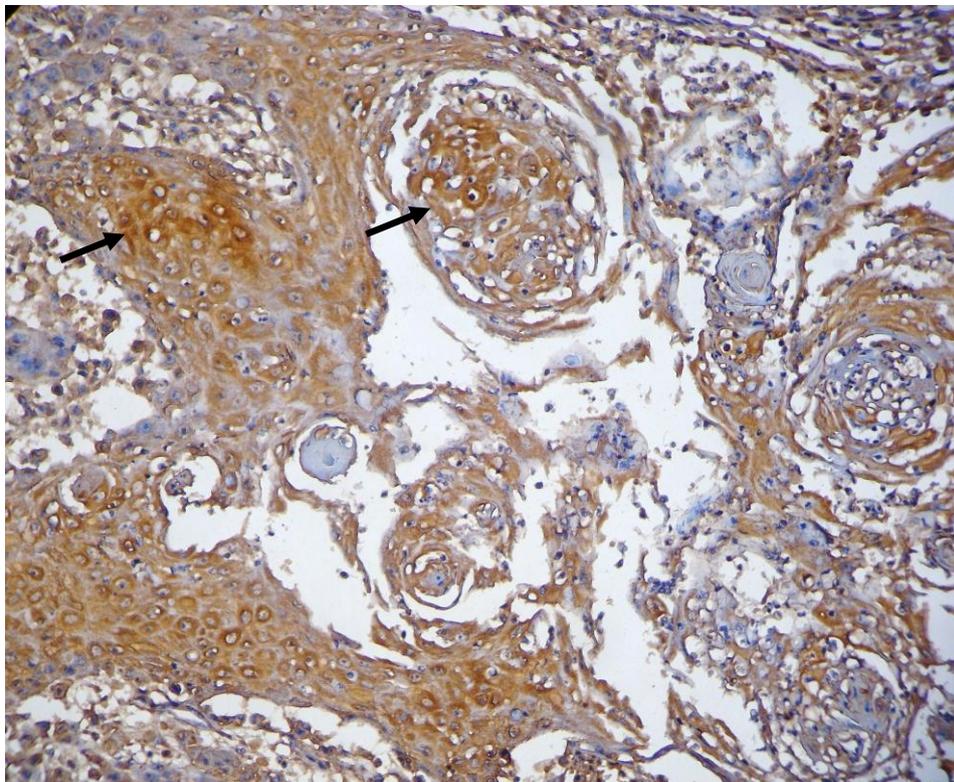


Figura 25: Cão. Pele. Microfotografia de CCE. Imunoistoquímica para MMP-9. Marcação (+++) ou forte (coloração castanha escura) (seta preta). Obj. 20x.

As amostras, ao serem agrupadas de acordo com o grau de malignidade e a análise da expressão imunohistoquímica das metaloproteinases nas células neoplásicas, demonstraram positividade para as MMPs nas classificadas como bem diferenciadas. Nas amostras classificadas como moderadamente diferenciadas, a expressão foi considerada como ausente (tabela 1).

Tabela 1: Relação das sete amostras de CCE de cães analisadas pela imunohistoquímica para a MMP-2 e -9 e a classificação histológica.

Amostras	Marcação MMP-2	Marcação MMP-9	Classificação
461	++	++	Bem Diferenciado
2028	+	++	Bem Diferenciado
675	++	+++	Bem Diferenciado
3113	+	+	Bem Diferenciado
3620	0	0	Mod. Diferenciado
1939	0	0	Mod. Diferenciado
3465	0	0	Mod. Diferenciado

MMP-Metaloproteinase de matriz extracelular

4 DISCUSSÃO

Dentre as especialidades veterinárias que atualmente se destacam, está a dermatologia (SCOTT *et al.*, 2001) e a oncologia (MACEWEN, 2001). Acredita-se que hoje, entre 20% e 75% dos atendimentos veterinários realizados em clínicas e hospitais estejam relacionados com problemas dermatológicos (SCOTT *et al.*, 2001). Isso se deve principalmente ao fato de que alterações de pele chamam a atenção dos proprietários e causam repulsa, fazendo com que se procure auxílio veterinário (CONCEIÇÃO *et al.*, 2004).

A pele e o tecido subcutâneo constituem os locais mais comuns de neoplasia em cães (cerca de 30%). Os cães sofrem com um número muito maior de tumores cutâneos que os gatos (WILKINSON; HARVEY, 1996). Além disso, há uma grande variedade de tumores de pele descrita em cães (PULLEY; STANNARD, 1990; GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; YAGER; SCOTT, 1993; YAGER; WILCOCK, 1994; SCOTT *et al.*, 2001; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002; GROSS *et al.*, 2005), o que dificulta aos clínicos de pequenos animais conhecerem todas essas condições.

Dentre essa vasta variedade de tumores de pele em cães, destaca-se o

Carcinoma de Células Escamosas que constitui o segundo tumor de pele mais comum em cães, seguido do mastocitoma. A incidência de CCE corresponde de 3% a 20% das neoplasias cutâneas (BEVIER; GOLDSCHMIDT, 1981; GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992), sendo esta variação um reflexo da localização geográfica. Neste estudo, foi encontrada uma prevalência maior do CCE em cães, representando 43% das amostras analisadas, quando comparada com as outras espécies. Esta neoplasia destaca-se por ser a forma mais comum de carcinoma da pele e por ter a exposição prolongada de radiação ultravioleta como uma das suas etiologias mais prováveis, tornando o Brasil um país favorável para o aparecimento deste tumor, já que no país o clima predominante é o tropical.

Conforme relatos de Goldschmidt e Schofer (1992) e Yager e Scott (1993), o carcinoma de células escamosas pode ocorrer em animais com menos de três anos, variando de 5 a 15 anos, sendo a média de idade 10 anos. Neste estudo também ficou evidenciada uma grande variação de idade dos cães afetados (2-13 anos), sendo a média encontrada de 6,4 anos.

Quanto à raça dos animais afetados com CCE nesse estudo, a maior incidência foi em cães sem raça definida (SRD), seguido pelos cães da raça Boxer, compatível com o estudo realizado por Strafuss *et al.* (1976), Rothwell *et al.* (1987) e Barros *et al.* (2008), onde cães de raças que não tem pelagem branca como os da raça Boxer estão entre as raças predisponentes ao CCE. A alta taxa de incidência dos tumores em cães sem raça definida (SRD) pode ser explicada pelo fato dos atendimentos ocorrerem em hospital-escola, como é o caso da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, origem da maioria dos materiais enviados ao Laboratório de Patologia Animal.

Observando o sexo dos animais, tanto as fêmeas quanto os machos foram acometidos, ainda que com maior percentagem nas fêmeas, confirmando que quando se trata de neoplasias cutâneas como o CCE não há distinção entre o sexo dos animais acometidos, conforme descrito por Scott *et al.* (1995), Goldschmidt e Hendrick (2002) e Souza *et al.* (2006).

No que diz respeito à localização das neoplasias, a maior incidência foi na região abdominal, devido ao fato de que das seis amostras encontradas nesta região, cinco eram de cadelas e duas destas estavam localizadas na glândula mamária, local considerado por muitos autores como sendo o mais comumente encontrado para a formação de tumores mamários em cadelas (ALLEN *et al.*, 1986;

LOAR, 1992; PIRES *et al.*, 2003; STRATMANN *et al.*, 2008). Os tumores de mama representam aproximadamente 52% de todas as neoplasias na cadela, sendo que 50% delas são malignas. E, dentre as malignas, cerca de 50% são os carcinomas, incluindo o carcinoma de células escamosas (RUTTEMAN *et al.*, 2007).

O segundo local mais acometido foi a região da bolsa escrotal, seguido do membro pélvico. De acordo com Scott *et al.* (2001), tumores na região do prepúcio e pênis não são raros, principalmente naqueles animais que possuem essa região despigmentada e desprovida de pêlos, sendo que sua prevalência aumenta com o efeito da radiação solar. Com relação às duas amostras localizadas no membro pélvico, uma apresentou lesão na parte interna da coxa, próxima à região inguinal, condizendo com os resultados encontrados por Goldschmidt e Hendrick (2002), White (1994), Scott *et al.* (1995) e Souza *et al.* (2006), onde cães de pelagem clara, como o caso do Boxer, podem apresentar a neoplasia nas regiões cutâneas abdominal e inguinal, dado o hábito de exposição solar em decúbito ventral e hipopigmentação da região abdominal.

Em relação ao CCE encontrado no leito ungueal do 3º dígito, Liu e Hohn (1968), O'Brien *et al.* (1992), Marino *et al.* (1995), Henry *et al.* (2005), Withrow e Macewen (2007) e Wobeser *et al.* (2007) descreveram que este tipo de neoplasia é normalmente encontrada em cães, representando mais de 30% das neoplasias encontradas neste local, neste estudo uma amostra (7,69%) apresentou CCE em leito ungueal. Também de acordo com estes autores, os carcinomas subungueais são localmente invasivos, com evidências radiográficas de lise óssea e formação de novo osso periosteal em 80% dos cães acometidos. A taxa metastática relatada do CCE digital é variável dentro da literatura veterinária, com relatos de taxa de metastatização variando de 4,7% a 24,1% (BYERS; FLEISCHMAN, 1984; SCOTT; MILLER, 1992). De acordo com Goldschmidt e Thrall (1985) e Goldschmidt e Schofer (2005), o que se encontra histologicamente é uma extensa área de destruição do tecido ósseo com invasão do tecido subungueal por cordões de células epiteliais escamosas neoplásicas; essas células variam em grau de diferenciação, mas na maioria das vezes formam grandes pérolas de queratina, confirmando assim os achados encontrados neste estudo.

Os outros locais atingidos pelo CCE foram a pele da região cervical, região que está altamente exposta a radiação ultravioleta, principal causa do aparecimento de CCE em cães e a pálpebra. De acordo com Slatter (2005), o CCE pode ter

origem palpebral, embora seja pouco descrito em cães, representando apenas 2,5% de 202 casos estudados. Histologicamente o carcinoma de células escamosas de pálpebra pode ser classificado como bem diferenciado ou pouco diferenciado. Tumores bem diferenciados possuem células epiteliais poligonais grandes semelhantes às células da camada espinhosa, com pontes intercelulares, contendo muitas vezes, pérolas de queratina. Tumores pouco diferenciados são altamente anaplásicos e tem pequenas células hipercromáticas com pouca queratinização (KIRCHER *et al.*, 1974).

Na medicina humana, existem atualmente cinco formas de classificação histológica para os carcinomas de células escamosas. Essas classificações surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes.

As cinco classificações utilizadas são: classificação descritiva de 1920 de Broders de 1920 (1941), baseada no grau de diferenciação celular, onde os carcinomas foram divididos em quatro graus, variando de 1 a 4; o sistema multifatorial de Anneroth e Hansen (1984); o sistema de gradação das margens invasivas proposto por Bryne *et al.* (1989); a avaliação histopatológica de risco desenvolvida por Brandwein-Gensler *et al.* (2005) e o sistema de gradação histopatológica desenvolvido por Wahi (1971), publicado pela OMS, e revisado por Barnes *et al.* (2005), que baseia na classificação da neoplasia através de seu grau de malignidade, dividindo-se em três categorias: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (LOURENÇO *et al.*, 2007). Nesta classificação da OMS, os bem diferenciados foram assim denominados quando sua arquitetura tecidual se assemelhou a um padrão normal de epitélio escamoso. Já aqueles que se mostraram pouco diferenciados, caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima queratinização. Os CCEs moderadamente diferenciados apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização (BARNES *et al.*, 2005).

Na medicina veterinária, o sistema de gradação que vem sendo utilizado para a classificação do CCE é aquele adotado pela OMS e desenvolvido por Weiss e Frese (1974) que classifica o CCE em bem diferenciados, diferenciados e pouco diferenciado. Há também o sistema de gradação de Broders descrito por Goldschmidt e Schoffer (1992) onde o CCE é dividido em quatro graus histológicos: grau I ou bem diferenciado, quando apresenta numerosas “pérolas de queratina” e

pontes intercelulares claramente evidentes com mínima atividade mitótica e pleomorfismo nuclear; grau II e III ou moderadamente diferenciados, quando apresenta “pérolas de queratina” ocasionais, pobres definições de pontes intercelulares e moderada atividade mitótica e hiperchromatismo nuclear; e grau IV ou pouco diferenciado, quando mostra pouca diferenciação escamosa, mas com acentuada atividade mitótica, pleomorfismo nuclear e hiperchromatismo. As 13 amostras, se classificadas pelo sistema de Broders, também seriam: cinco CCEs grau I ou bem diferenciados, cinco CCEs grau II e/ou III ou moderadamente diferenciados e três CCEs grau IV ou pouco diferenciados.

Segundo estudos realizados por Costa *et al.* (2002) e Dantas *et al.* (2003) em carcinomas epidermóides orais em humanos há uma tendência de que, na gradação histopatológica da OMS, por apresentar apenas três graus, a maioria dos tumores seja classificado no grau intermediário, o que não ocorreu neste estudo.

O parâmetro morfológico mais importante para a classificação do CCE em cães observado neste estudo foi o pleomorfismo nuclear e celular, que apresentou pouca divergência (7,7%) quando comparado aos parâmetros número de mitoses, pérolas de queratina e pontes intercelulares (23-46%). Na literatura, o enfoque principal é sempre a classificação histológica (PARADIS *et al.*, 1989; ESPLIN *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2008), não havendo dados sobre análise dos parâmetros morfológicos, como o realizado neste estudo.

A classificação histológica realizada neste estudo apresentou algumas divergências com a classificação proposta pela OMS. As divergências encontradas podem indicar a necessidade de análises mais precisas destes parâmetros morfológicos para a classificação de CCE em cães, já que um erro de diagnóstico pode prejudicar a conduta terapêutica do médico veterinário. Portanto, mais estudos precisam ser realizados a fim de se chegar a um consenso sobre a classificação histopatológica que possua maior poder preditivo e que preencha todas as características importantes para a classificação.

Das amostras analisadas, a de número 107 localizada na pálpebra de um cão, macho, raça Boxer e com 11 anos, foi classificada como pouco diferenciada, apesar de apresentar pouco pleomorfismo celular e nuclear e número reduzido de mitoses acima da camada basal, o que a classificaria como CCE bem diferenciado. Esta amostra assim como a amostra analisada por Montiani-Ferreira *et al.* (2008) em um carcinoma de células escamosas de córnea, não apresentou pérolas de

queratina, apesar de apresentar células epiteliais poligonais com núcleos grandes com citoplasma eosinofílico abundante, características do CCE.

Com relação à análise imunohistoquímica, a ausência de expressão da proteína p53 pode ter ocorrido devido ao processamento das amostras utilizadas neste estudo, que podem ter sido fixadas por muito tempo no formaldeído, principal fixador utilizado na rotina histológica e imunohistoquímica (RAMOS-VARA, 2005). De acordo com Hayat (2002), a fixação excessiva pode produzir resultados falso-negativos devido a um excesso de reações cruzadas. Outra hipótese, além do processamento, é o fato de que o anticorpo utilizado neste experimento não era específico para cães. Conforme Ruiz *et al.* (2005), a maior dificuldade no uso da imunohistoquímica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Neste caso, a utilização de anticorpos não específicos pode ter ocasionado um resultado negativo nas amostras analisadas. No caso da e-caderina, a expressão pode ser visualizada tanto no epitélio neoplásico como no epitélio não neoplásico, porém com menos intensidade. Neste estudo não foi observada a expressão da e-caderina no carcinoma das amostras analisadas; o que pode ser observado foi uma expressão muito reduzida da e-caderina em epitélio não neoplásico. A ausência da expressão e-caderina poderia ser explicada pelas mesmas razões citadas para a p53.

A expressão das MMPs -2 e -9 foram detectadas tanto na epiderme não neoplásica como na epiderme neoplásica. Na epiderme não neoplásica, a expressão das MMPs foi identificada nos queratinócitos das camadas basais, nas glândulas sebáceas e no tecido conjuntivo. Esses achados têm sido descritos por outros autores em epiderme de pele não associada à neoplasia, fato que tem sido interpretado como expressão antigênica constitutiva (MONHIAN, 2005; RAITIO, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2008).

As metaloproteinases -2 e -9 são capazes de clivar o colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal, primeira barreira para a progressão de células epiteliais neoplásicas. Isto parece ser possível porque a atividade das metaloproteinases nas células tumorais enfraquece a membrana basal epitelial e endotelial, no qual o colágeno tipo IV representa o principal componente estrutural. Desta forma, as gelatinases desempenham um importante papel nos processos de invasão tumoral e metástase (HONG *et al.*, 2000; LEV *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2003; RAUVALA *et al.*, 2005). Um achado interessante neste estudo e relatado também

por Paparella *et al.* (1997 e 2002) foi a imunomarcagem das MMP-2 e -9 nas células fibroblásticas localizadas perto da infiltração de células neoplásicas. Zucker e Biswas (1994) demonstraram que as células cancerígenas induzem os fibroblastos a produzirem as metaloproteinases, por meio de fatores estimuladores de colagenase do tumor. De acordo com estes autores, as MMPs são sintetizadas e secretadas pelas células mesenquimais e absorvidas pelas células neoplásicas.

A reação positiva de quatro amostras para as metaloproteinases 2 e 9 (não encontrada nas outras proteínas) pode ser em função da homologia existente entre as espécies (SANG; DOUGLAS, 1996; COUGHLAN *et al.*, 1998). Por exemplo, a MMP-2 possui 96-98% de homologia entre ratos; camundongos; coelhos; seres humanos e bovinos; e a MMP-9 possui de 75-85% homologia entre as mesmas espécies citadas (LANA *et al.*, 2000).

Um importante fator prognóstico para o comportamento das neoplasias é o grau histológico ou grau de malignidade. O atual potencial metastático do CCE é desconhecido, mas acredita-se que o carcinoma pouco diferenciado possua um prognóstico mais desfavorável que as demais classificações. Assim sendo, ao se tentar relacionar o grau de malignidade com a expressão das metaloproteinases, observou-se neste estudo que das quatro amostras consideradas positivas para ambas as MMPs todas foram classificadas como bem diferenciadas e as três amostras negativas para ambas as MMPs foram classificadas como moderadamente diferenciadas. Apesar de encontrar uma relação entre as classificações e a expressão, o que poderia indicar que CCEs bem diferenciados apresentam um poder de invasão maior que os moderadamente diferenciados, indicando que se não retirados no início do desenvolvimento do tumor poderiam tornar-se um CCE pouco diferenciado e levar a um prognóstico mais desfavorável ao paciente, este estudo não permite concluir se houve uma correlação significativa entre a expressão das MMPs e o grau de malignidade do CCE, devido um número pequeno de amostras. Outros autores relataram não encontrar correlação entre a imunoreatividade das MMPs e o grau histológico dos tumores, como por exemplo, Lana *et al.* (2000) em osteossarcoma canino, Leibman *et al.* (2000) em mastocitoma canino e Papparella *et al.* (2002) em carcinomas mamários caninos.

5 CONCLUSÃO

O parâmetro morfológico considerado o mais importante neste estudo foi o pleomorfismo nuclear e celular que se manteve consistente na maioria das amostras, divergindo somente em uma das treze amostras analisadas. Número de mitoses, presença de pérolas de queratina e pontes intercelulares apresentaram divergências, porém, em número maior de amostras que o pleomorfismo nuclear e celular. Parâmetros como presença de cordões ou fileiras, população densa de células neoplásicas, estroma, metaplasia, tipo de infiltrado inflamatório e estágio de invasão foram considerados secundários a classificação.

Com relação à imunoistoquímica, a ausência de expressão da p53 e e-caderina em carcinoma de células escamosas de caninos encontradas neste estudo não permite afirmar que essas proteínas não são expressas neste tumor, visto que os anticorpos não eram específicos para cães. Além disso, a falta de dados sobre a fixação das amostras realizadas previamente à imunoistoquímica também poderia explicar a ausência de expressão destas proteínas.

Quanto as metaloproteinases -2 e -9, os achados imunoistoquímicos encontrados neste estudo sugerem que as MMPs sintetizadas pelas células neoplásicas tenham um papel importante no comportamento agressivo do carcinoma de células escamosas de cães e que o emprego destes marcadores na rotina da histopatologia veterinária poderia ser um indicador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas em cães.

REFERÊNCIAS

ALLEN S.W.; PRASSE K.W.; MAHAFFEY, E.A. Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**. v.23, p. 649-655, 1986.

ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodological study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Oral Sciences**. v. 92, p. 448-68, 1984.

BARNES L, EVESON, JW, REICHART P, SIDRANSKY D. **World Health Organization Classification of Tumours**. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

BARROS, R.M.; JACOBINA, G.C.; ECCO, R.; SILVA, C.E.V.; GALERA, P.D. Carcinoma da células escamosas multicêntrico em um cão. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 9, n.1, p.103-108, 2008.

BEVIER, D.F.; GOLDSCHIMDT, M.H. Skin Tumors in the dog. Part I: Epithelial tumors and tumor-like lesions. **Compendium of Continuous Education**. v. 3, p. 389-98, 1981.

BIRCHMEIER, W.; BEHRENS, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junction and the prevention of invasiveness. **Biochimica et biophysica acta CR Reviews on cancer**. v. 1198, p. 11-26, 1994.

BRANDWEIN-GENSLER, M.; TEIXEIRA, M.S.; LEWIS, C.M.; LEE, B.; ROLNITZKY, L.; HILLE, J.J. GENDEN, E.; URKEN, M.L.; WANG B.Y. Oral squamous cell carcinoma. Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **American Journal of Surgical Pathology**. v.29, n.2, p.167-78, 2005.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surgical Clinic North America**. v. 21, n. 4, p.947-62, 1941.

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

BRYNE, M.; KOPPANG, H.S.; LILLENG, R.; KJAERHEIM, Ä. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**. v. 166, p. 375-8, 1989.

BYERS, J.C.; FLEISCHMAN, R.W. Canine digital neoplasia. **Canine practice**. v.11, p.25–33, 1984.

CARVALHO, T.; VALA, H.; PINTO, C.; PINHO, M.; PELETEIRO, M. Immunohistochemical Studies of Epithelial Cell Proliferation and p53 Mutation in Bovine Ocular Squamous Cell Carcinoma. **Veterinary Pathology**. v. 42, p. 66-73, 2005.

CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas – revisão. **Clínica Veterinária**. Ano XI, n. 61, março/abril, p. 56-64, 2006.

CHAMBERS, A.F.; MATRISIAN, L.M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **Journal of the National Cancer Institute**. v.89, n. 17, p. 1260-70, 1997

CONCEIÇÃO, L.G.; LOURES, F.H.; CLEMENTE, J.C.; FABRIS, V.E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia - revisão - parte 1. **Clínica Veterinária**, ano 9, p.36-44, 2004.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, M. D. V.; COLLINS, M. D. T. **Robbins pathologic basis of disease**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2000.

COSTA, A.L.L.; PEREIRA, J.C.; NUNES, A.A.F.; ARRUDA, M.L.S. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v.16, n.3, p. 216-20, 2002.

COUGHLAN, A.R.; ROBERTSON, D.H.; BURKE, R.; BEYNON, R.J.; CARTER, S.D. Isolation and identification of canine matrix metalloproteinases-2 (MMP-2). **Veterinary Journal**. v. 155, p. 231-237, 1998.

DANTAS, D.D.L.; RAMOS, C.C.F.; COSTA, A.L.L.; SOUZA, L.B.; PINTO, L.P. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. **Brazilian Dental Journal**. v.14, n.1, p. 22-25, 2003.

DEVILEE, P.; VAN LEEUWEN, I.S.; VOESTEN, A. RUTTEMAN, G. R.; VOS, J.H.; CORNELISSE, C. J. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. **Anticancer Research**. v. 14, p. 2039–2046, 1994.

ESPLIN, D.; WILSON, S.; HULLINGER, G. Squamous cell carcinoma of the anal sac in five dogs. **Veterinary Pathology**. v.40, n.3, p.332-334, 2003.

FERNANDES, C.G. Neoplasias em Ruminantes e Equinos. In: **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2ª ed. São Paulo: Eds, v. 2, p. 538–544, 2001.

FERREIRA, I.; RAHAL, S. C.; FERREIRA, J.; CORREA, T. P. Terapêutica no carcinoma de células escamosas. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.36, n.3, p.1027-1033, 2006.

GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, C. G. Over expression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 58, p. 857-863, 1997.

GOLDSCHMIDT, M. H. THRALL, D.E. **Nonosseous Tumors Invasive of Bone**. In: NEWTON, C.D.; NUNAMAKER, D.M. Textbook of small animal orthopaedics. 1 ed.

Philadelphia: Lippincott, 1985. 1140p.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. **Skin tumors of the dog and cat**. Oxford: Pergamon, 1992. 316p.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUNTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Ames: Iowa State Press, p. 45–118, 2002.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. **Subungual Squamous Cell Carcinoma**. 2005. Disponível em: <http://www.oncolink.org/types/article.cfm?c=22&s=69&ss=807&id=9527>. Acesso dia 17 de abril de 2010.

GOURLEY, I.M.; MADEWELL, B.R.; BARR, B. ETTINGER, S.J. Burn Scar malignancy in a dog. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 180, p. 1095-6, 1982.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLFER, V.K. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. Iowa: Blackwell Publishing, 2005. 932p.

HARGIS, M. A.; GINN, P. E. The Integument. In: **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4. ed. Missouri: Mosby Elsevier, p. 1107-1261, 2007.

HAYAT, M.A. Fixation and embedding. In: HAYAT, M.A. Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods for Light and Electron Microscopy. New York: Kluwer Academic, pp. 71–93, 2002.

HENRY, C.J. ; BREWER, W.G. Jr; WHITLEY, E.M. ; TYLER, J.W. ; OGILVIE, G.K. ; NORRIS, A. ; FOX, L.E. ; MORRISON, W.B. ; HAMMER, A. ; VAIL, D.M. ; BERG, J. Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 19, p. 720-724, 2005.

HONG, S.D.; HONG, S.D.; LEE, J.; LIM, C.Y. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncology**. v. 36, p. 207-13, 2000.

IGGO, R.; BARTEK, J.; LANE, D.; GATTER, K.; HARRIS, A.L.; BARTEK, J. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer . **The Lancet**. v. 335,8691, n. p. 675-679, 1990.

JIANG, W.G. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. **British Journal of Surgery**. v 83, n. 4, p.437-446, 1996.

JOÃO, C.F. Expressão da e-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. **Dissertação (Mestrado)**. 2008. 60f. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Ambientais. 2008.

KIRCHER, C.H.; GARNER, F.M.; ROBINSON, F.R. Tumours of the eye and adnexa.

Bulletin of the World Health Organization–International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. v. 50, n.1-2, p.135-142, 1974.

KNUDSEN K.A.; WHEELLOCK, M.J. Cadherins and the mammary gland. **Journal of cellular Biochemistry.** v. 95, p. 488-496, 2005.

KRAEGEL, S.A.; MADEWELL, B.R. **Tumores da pele.** In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004, v.1, cap.99, p.555-561.

LANA, S.E.; OGILVIE, G.K.; HANSEN, R.A.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. **American Journal of Veterinary Research.** v. 61, p.111–114, 2000.

LEIBMAN, N.F.; LANA, S.E.; HANSEN, R.A.; POWERS, B.E.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J.; OGILVIE, G.K. Identification of Matrix Metalloproteinases in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 14, p. 583-586, 2000.

LEV, S.; GILBURD, B.; LAHAT, N.; SHOENFELD, Y. Prevention of tumor spread by matrix metalloproteinase-9 inhibition: old drugs, new concept. **European Journal of Internal Medicine.** v. 13, n. 2, p. 101-103, 2002.

LIU, S.K.; HOHN, R.B. Squamous cell carcinoma of the digit of the dog. **Journal of American Veterinary Medical Association.** v.153, p.411-424, 1968.

LOAR, A.S. **Tumores do Sistema Genital e Glândulas Mamárias.** In: Ettinger S.J. Tratado de Medicina Interna Veterinária. 3.ed. São Paulo: Manole Ltda. 1992. p.1900-1906.

LOUKOPOULOS, P.; MUNGALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Involvement in Canine Tumors. **Veterinary Pathology.** v. 40, p. 382–394, 2003.

LOURENÇO, S. Q. C.; SCHUELER, A.F. ; CAMISASCA, D.R. ; LINDENBLATT, R.C. ; BERNARDO, V.G. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 53, n.3, p. 325-333, 2007.

LYAKHOVITSKY, A.; BARZILAI, A.; FOGEL, M.; TRAU, H.; HUSZAR, M. Expression of E-Cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. **The American Journal of Dermatopathology.** v. 26, n. 5, p. 372-378, 2004.

MACEWEN, E.G. Tumors miscellaneous. In: WITHROW, S.J.; MacEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology.** 3.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. Cap.29, p.639-646.

MAIOLINO, P.; PAPPARELLA, S. ; RESTUCCI, B. ; DE VICO, G. Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative

analysis. **Journal of Comparative Pathology**. v.125, p.117-121, 2001.

MANDARA, M.T.; PAVONE, S.; MANDRIOLI, L.; BETTINI, G. FALZONE, C.; BARONI, M. Matrix Metalloproteinase-2 and Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Canine and Feline Meningioma. **Veterinary Pathology**. v. 46, n. 5, p. 836-845, 2009.

MARINO, D.J.; MATTHIESEN, D.T.; STEFANACCI, J.D.; MOROFF, S.D. Evaluation of dogs with digital masses: 117 cases (1981–1991). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v.207, p.726–728, 1995.

MATOS, A.J.F.; LOPES, C.; CARVALHEIRA, J.; SANTOS, M.; RUTTEMAN, G.R.; GARTNER, F. E-Cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinical-pathological variables. **Journal of Comparative Pathology**. v. 134; p. 182-189, 2006.

MAYR, B.; DRESSLER, A.; REIFINGER, M.; FEIL, C. Cytogenetic alteration in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 59, p. 69-78, 1998.

MAYR, B.; REIFINGER, M.; ALTON, K. Novel canine tumor suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. **Veterinary Research Communications**. v. 23, p. 285–291, 1999.

MENDOZA, S.; KONISHI, T.; DERNELL, W. S.; WITHROW, S. J.; MILLER, C. W. Status of p53 and MDM2 genes in canine osteosarcoma. **Anticancer Research**. v. 18, p. 4449-4453, 1998.

MILLER, W.H.; SHANLEY, K.J. Bilateral pinnal squamous cell carcinoma in a dog with chronic otitis externa. **Veterinary Dermatology**. v. 2, n. 37, 1991.

MISDORP, W.; ELSE, R. W.; HELLMEN, E. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. **Armed Forces Institute of Pathology**. v. 7, n. 1, p. 1 59, 1999.

MONHIAN, N. Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. **Archives of Facial Plastic Surgery**. v. 7, n. 4, p. 238-43, 2005.

MONTIANI-FERREIRA, F.; KIUPEL, M.; MUZOLON, P.; TRUPPEL, J. Corneal squamous cell carcinoma in a dog: a case report. **Veterinary Ophthalmology**. v. 11, n. 4, p. 269-272, 2008.

MORALES, D.S.R.; PENIDO, N.O.; SILVA, I.D.C.G.; STÁVALE, J.N.; GUILHERME, A.; FUKUDA, Y. Matriz Metaloproteinase 2: um importante marcador genético para coleostomas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 73, n. 1, p. 55-61, 2007.

MURAKAMI, Y.; TATEYAMA, S.; RUNGSIPIPAT, A.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, R. Immunohistochemical analysis of Cyclin A, Cyclin D1, p53 in Mammary tumors,

Squamous Cell Carcinomas, Basal Cell Tumors of Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Science**. v. 62, n. 7, p. 743-750, 2000.

O'BRIEN, M.G.; BERG, J.; ENGLER, S.J. Treatment by digital amputation of subungual squamous cell carcinoma in dogs: 21 cases (1987–1988). **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 201, p.759–761, 1992.

OWSTON, M. A. RAMOS-VARA, J.A. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a leydig cell tumor in a dog. **Veterinary Pathology**. v. 44, n. 6, p. 936-943, 2007.

PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, dysplastic and neoplastic canine mammary gland. **Journal of Comparative Pathology**. v. 117, p. 277-282, 1997.

PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; PACIELLO, O.; MAIOLINO, P. Expression of metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**. v. 126, p. 271-276, 2002.

PARADIS, M.; SCOTT, D.; BRETON, L. Squamous cell carcinoma of the nail bed in three related giant schnauzers. **The Veterinary Record**, v.125, p.322-324, 1989.

PIEKARZ, C.H.; BIONDO, A.W.; AMORIM, R.L.; RODASKI, S.; BARROS FILHO, I.R.; DE NARDI, A.B. Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas. **Archives of Veterinary Science**. v. 13, n. 1, p. 13-21, 2008.

PIRES M.A.; TRAVASSOS F.S.; PIRES I. Neoplasias em canídeos - Um estudo descritivo de 6 anos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.98, p. 111-118, 2003.

PIRES, I. ALVES, A. RODRIGUES, P. QUEIROGA, F.L. LOPES, C. S. E-cadherin expression in canine cutaneous histiocytoma. **Veterinary Record**. v. 163, n.2, p. 59-60, 2008.

POLTON, G.A. BREARLEY, M.J.; GREEN, L.M.; SCASE, T.J. Expression of E cadherin in canine anal sac gland carcinoma and its association with survival. **Veterinary and Comparative Pathology**. v. 5, n. 2, p. 232-238, 2007.

POWERS, B.E. **The Pathology of Neoplasia**. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN E.G. Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 2007.846p.

PULLEY, L.T.; STANNARD, A.A. Tumors of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Berkeley: University of California, 1990. Cap.2, p.23-87.

RAITIO, A. Levels of matrix metalloproteinase-2, -9 and -8 in the skin, serum and saliva of smokers and nonsmokers. **Archives of Dermatology Research**. v. 297, n. 6, p. 242-8, 2005

RAMOS-VARA, J.A. Technical aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. v. 42, p. 405-426, 2005.

RAUVALA, M.; PUISTOLA, U.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. **Gynecologic Oncology**. v. 99, n. 3, p.656-663, 2005.

RIBEIRO, R. I. M. A.; BORGES JR, P. C.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 44, n. 2, p. 115-12, 2008.

ROTHWELL, T.L.W.; HOWLETT, C.R.; MIDDLETON, D.J. Skin neoplasms of dogs in Sydney. **Australian Veterinary Journal**. v.64, p-161-164, 1987.

RUIZ, F.S.; ALESSI, A.C.; CHAGAS, C.A.; PINTO, G.A.; VASSALO, J. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41, n. 4, p.263-270, 2005.

RUTTEMAN, G.R.; WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Tumors of the mammary gland**. In: Small Animal Clinical Oncology. 4th ed. WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2007.846 p.

SANG, Q.A.; DOUGLAS, D.A. Computational sequence analysis of matrix metalloproteinases. **Journal of Protein Chemistry**. v. 15, p. 137–160, 1996.

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; DE TOLLA, L.; BRUNETTI, B.; BENAZZI, C. E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, n. 6, p. 542-547, 2004.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Disorders of the claw and claw bed in dogs. **Compendium Continued Education Veterinary**. v.14, p.1448–1458, 1992.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Tumores neoplásicos e não neoplásicos**. In: Dermatologia de pequenos animais. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. cap.19, p.926-1054, 1995.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk Dermatologia de Pequenos Animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros Edições Ltda. 1996. 1142 p.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. **Muller & Kirk – Dermatologia dos Pequenos Animais**. 6. Ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001. 1528 p.

SETOGUCHI, A.; SAKAI, T.; OKUDA, M.; MINEHATA, K.; YASAWA, M.; ISHISAKA, T.; WATARI, T.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. **American Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 433-439, 2001.

SOUZA, T.M.; FIGHERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural – Santa Maria**. v.36, n.2, p.555-560, 2006.

SLATTER, D. **Pálpebras**. In: Fundamentos de oftalmologia veterinária. 3ª ed. São Paulo: Roca, 2005, cap.7, p.159-220.

STRAFUSS, A.; COOK, J.; SMITH, J. Squamous cell carcinoma in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**. v.168, p.435-427, 1976.

STRATMANN N.; FAILING K.; RICHTER A.; WEHREND A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**. v. 37, p. 82-86, 2008.

TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion receptors as morphogenetic regulator. **Science**. v. 251, n. 5000, p. 1451-1455, 1991.

TEIKFE, J.; LOHR, C. Immunohistochemical detection of p53 over expression in paraffin wax- embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**. v.114, p. 205-210, 1996.

THOMAS, R.C; FOX, L.E. Tumors of the skin and subcutis. In: MORRISON, W.B. **Cancer in dogs and cats**. 2. ed. Jackson: Teton NewMedia, 2002. Chap.32, p.469-488.

TSAI, C.H.; HSIEH, Y.S.; YANG, S.F.; CHOU, M.Y.; CHANG, Y.C. Matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 expression in oral squamous cell carcinoma and the effect of protein kinase inhibitors: preliminary observations. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**. v. 95, n. 6, p. 710-716, 2003.

VELDHOEN, N.; STEWART, J.; BROWN, R.; MILNER, J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**. v. 16, p. 249-255, 1998.

WAHI, P. M. **Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1971.

WEISS, E.; FREZE, K. Tumours of the Skin. In: **Bulletin of the World Health Organization–International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. v. 50, n.1-2, p. 79–100, 1974.

WESTERMARCK, J.; KAHARI, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **The FASEB Journal**. v.13, p. 781-91, 1999.

WILKINSON, G.T.; HARVEY, R.G. **Atlas colorido de dermatologia dos pequenos animais: guia para o diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. 304p.

WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3 ed. Philadelphia: Pennsylvania, p. 381-383, 2007.

WHITE, R.A.S. **Manual of small animal oncology**. Ames: Iowa State Press, 1994.

WOBESER, B. K.; KIDNEY, B. A.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. J.; MAYER, M. N.; SPINATO, M. T.; ALLEN, A. L. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. **Veterinary Pathology**. v.44, p.355-361, 2007.

YAGER, J.A.; SCOTT, D.W. The skin and appendages. In: JUBB, K.V.F. *et al.* **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic, 1993. Cap.5, p.537-538.

YAGER, J.A.; WILCOCK, B.P. **Color atlas and text of surgical pathology of the dog and cat: dermatopathology and skin tumors**. London: Wolfe, 1994. Cap.3, p.239-313

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

ZUCKER, S.; BISWAS, C. Tumour collagenase stimulating factor: a paracrine stimulator of fibroblast production of matrix metalloproteinase in cancer. **Bulletin de l' Institut Pasteur**. v. 92, p. 284-290, 1994.