Danielle Almeida Zanini

Estudo comparativo dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e do carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal de caninos domésticos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Zaidan
Dagli

**São Paulo
2017**

Danielle Almeida Zanini

Estudo comparativo dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e do carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal de caninos domésticos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Zaidan
Dagli

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Zanini, Danielle Almeida

Estudo comparativo dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e do carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal de caninos domésticos / Danielle Almeida Zanini. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Lúcia Zaidan Dagli.

Descritores: 1.Carcinoma 2.Pele 3.Neoplasia 4.Proteína supressora de tumor p53 5.Caderina 6.Luz solar 7.Modelos animais

USP/FM/DBD-163/17

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo comparativo dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e do carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal de caninos domésticos" protocolo nº 051/14 sob a responsabilidade de Maria Lúcia Zaidan Dagli e Danielle Almeida Zanini, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad Referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 14.09.2015

Vigência do Projeto	Dezembro/2016
Espécie/linhagem	Cães – Atendidos no Hos.Vet-FMVZ USP
Nº de animais	30

CEUA-FMUSP, 14 de Setembro de 2015

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO COMPARATIVO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, MORFOLÓGICOS E MOLECULARES DA CERATOSE ACTÍNICA E DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA PELE DA REGIÃO VENTRAL ABDOMINAL DE CANINOS DOMÉSTICOS", protocolada sob o CEUA nº 9596111213, sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** e equipe; Danielle Almeida Zanini - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 11/02/2016.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 30 Dogs (30 males), protocol number CEUA 9596111213, under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli** and team; Danielle Almeida Zanini - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/11/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/01/1** a **31/01/1**

Área: **Patologia**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos**

Idade: **a**

N: **30**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: Os tumores cutâneos e subcutâneos em cães representam um terço das neoplasias nesta espécie. O carcinoma de células escamosas (CCE) representa cerca de 5% das neoplasias cutâneas em cães e trata-se de uma neoplasia maligna com origem no epitélio estratificado escamoso da pele e de outras superfícies mucosas. A etiologia do CCE em cães não é bem definida, porém é descrito na literatura que a exposição aos raios solares (UV) é um importante fator ao desenvolvimento desta neoplasia. O CCE acomete mais frequentemente cães de pelagem branca e animais de meia idade. O CCE, frequentemente, é precedido pela ceratose actínica. O diagnóstico destas duas afecções se dá por meio de exame histopatológico. Este trabalho tem como objetivo comparar aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e carcinoma de células escamosas da pele da região abdominal ventral de cães. Para tanto, realizaremos coleta de no mínimo 10 amostras de carcinoma de células escamosas, 10 amostras de ceratose actínica e 10 amostras de pele normal de região abdominal ventral de caninos domésticos para exame histopatológico. A partir dos blocos das amostras colhidas, será confeccionado elaborado um bloco para as demais análises em microarray tecidual. Será quantificado o índice mitótico, e, por imuno-histoquímica, a proliferação celular por meio da expressão de Ki-67, a expressão de caderina-E, de p53 mutado, o índice apoptótico por meio da marcação da Caspase-3. Além disso, será quantificada a metilação global do DNA por meio da marcação, por imuno-histoquímica, da 5-metil citosina. Espera-se desta forma contribuir com o conhecimento da carcinogênese cutânea (epiderme) e seus aspectos moleculares.

Local do experimento:

São Paulo, 15 de abril de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mauro Zanini e Silvana Aparecida de Almeida Zanini, por sempre me apoiarem em tudo e por estar sempre ao meu lado me dando muita força.

Ao Paulo Ricardo Domingues Reviglio, meu namorado, por sempre estar presente, me ajudando e se dedicando para ver as coisas dando certo. Por ser meu maior incentivador em tudo que almejo.

Aos meus cachorros (Anita, Malu, Gabriella, Jujuba, Tuca e Harley) e minha égua (Andrômeda) por se tornarem um refúgio quando as coisas não iam bem e por me trazer uma alegria incomensurável.

Aos meus amigos, principalmente a Dyanne Cappelozza e Aline Di Fiore, por sempre entenderem minha ausência.

Ao meu avô, Antônio Zanini, que nos deixou tão repentinamente e já deixa uma saudade enorme.

À minha/meu sobrinha(o), que fiquei sabendo há pouco tempo da existência e que já amo sem limites e que já me faz querer mais, para ser a tia que ela possa se espelhar.

A todos os profissionais do Hospital Veterinário Anhanguera de São Paulo que iniciaram essa jornada comigo e sempre me apoiando, principalmente a Ana Paula de Moraes.

A todos os profissionais do Hospital Veterinário Anhembi Morumbi principalmente ao Professor Ronaldo Lucas por entender minhas ausências quando havia necessidade de ir

a FMVZ/USP, as minhas residentes (Karina, Mariane, Larissa, Laíz) por segurarem a barra da rotina quando eu estava ausente.

À Adriana Tomoko Nishiya por ser meu espelho de profissional e por sempre me aconselhar e me incentivar a melhorar.

À professora Maria Lúcia Zaidan Dagli, por acreditar em mim desde a graduação quando fiz iniciação científica e agora no mestrado, só tenho a agradecer toda a confiança e ensinamento.

À Marguiti Isaura Soares por toda ajuda no laboratório, sem ela muito deste trabalho não seria possível.

Ao Rodrigo Réssio, do Instituto Adolfo Lutz, e suas aprimorandas, que me ajudaram com toda a eficiência e paciência a realizar parte das minhas imuno-histoquímicas.

À professora Lilian Rose Marques de Sá, por ter se colocado a disposição para avaliar os histopatológicos deste estudo.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Epiderme	25
2.2	Ceratose actínica.....	27
2.3	Carcinoma de células escamosas.....	28
2.4	Exposição solar.....	29
2.5	p53.....	33
2.6	Ki-67.....	36
2.7	E-caderina.....	38
2.8	5 metilcitosina (5mc).....	39
2.9	Ciclo-oxigenase-2.....	41
2.9.a	Pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina.....	43
3	OBJETIVOS.....	44
3.1	Objetivos gerais.....	44
3.2	Objetivos específicos	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Animais e coleta de amostras.....	46
4.2	Análise microscópica	46
4.3	Técnica imuno-histoquímica (IHQ)	47
4.4	Quantificação das marcações por imuno-histoquímica (sistema de escores.....	48
4.4.1	Análise quantitativa de Ki-67 e 5 metilcitosina.....	49
4.5	Análise estatística	49
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Casos de CA e CCE.....	51

5.2	Características clínicas dos cães portadores de CA e CCE.....	51
5.3	Análise microscópica.....	55
5.4	Imuno-histoquímica.....	60
5.4.1	Ki-67.....	63
5.4.2	Ecaderina.....	66
5.4.3	5 metilcitosina.....	69
5.4.4	Ciclo-oxigenase-2.....	72
5.4.5	p53.....	75
5.4.6	Pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina.....	78
5.5	Análise estatística	81
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSÃO.....	86
8	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Composição da luz solar.....	30
Figura 2 - Penetração da radiação UV na pele.....	31
Figura 3 - Formação de ciclobutanos de pirimidina. Ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases.....	31
Figura 4 - Formação de fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Ligação covalente entre o C4 e C6 das bases da mesma banda.....	32
Figura 5 - Ação da radiação UVB em mutações do p53 acarretando falha na apoptose e proliferação celular.....	34
Figura 6 - Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas por ação da COX-2...	41
Figura 7 - Carcinoma de Células escamosas em teto de fêmea da raça American PitBull Terrier com padrão de lesão ulcerativo e eritematoso. Ao redor do teto presença de área de ceratose actínica com eritema e pápulas.....	53
Figura 8 - Carcinoma de Células Escamosas e Ceratose Actínica em prepúcio de cão da raça American PitBull Terrier.....	53
Figura 9 - Ceratose Actínica em região abdominal ventral de cão da raça American PitBull Terrier.....	54
Figura 10 - Pós-operatório de excisão de Carcinoma de células escamosas e ao redor presença de Ceratose Actínica em região abdominal ventral de cão da raça American PitBull Terrier.....	54

Figura 11 - Ceratose Actínica e carcinoma de células escamosas em região abdominal e torácica lateral de cão da raça Bull Terrier.....	55
Figura 12 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Epiderme com presença de hiperplasia irregular, hiperkeratose e pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x.....	56
Figura 13 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Integridade de camada basal. Coloração: PAS. Objetiva 4x.....	56
Figura 14 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Hiperplasia, hiperkeratose, parakeratose evidente, pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x.....	59
Figura 15 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Abundante proliferação de ceratinócitos neoplásicos invadindo a derme, formando ilhas. Intenso pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x.....	59
Figura 16 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Ausência de delimitação da camada basal. Coloração: PAS. Objetiva 4x.....	60
Figura 17 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Ki-67 em camada basal. Objetiva 4x.....	64
Figura 18 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Ki-67 em camada basal. Objetiva 20x.....	64
Figura 19 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de Ki-67. Objetiva 4x.....	65
Figura 20 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de Ki-67. Objetiva 20x.....	65

Figura 21 - Fotomicrografia de linfonodo de cão. Marcação de Ki-67 (controle positivo). Objetiva 4x.....	66
Figura 22 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de E-caderina. Objetiva 4x.....	67
Figura 23 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de E-caderina. Objetiva 20x.....	67
Figura 24 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de E-caderina. Objetiva 4x.....	68
Figura 25 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de E-caderina. Objetiva 20x.....	68
Figura 26 - Fotomicrografia de pele canina. Marcação de E-caderina (controle positivo). Objetiva 4x.....	69
Figura 27 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 4x.....	70
Figura 28 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 20x.....	70
Figura 29 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 4x.....	71
Figura 30 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 20x.....	71
Figura 31 - Fotomicrografia de linfonodo de cão. Marcação de 5 metilcitosina (controle positivo). Objetiva 4x.....	72

Figura 32 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de COX-2. Objetiva 4x.....	73
Figura 33 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando Ceratose actínica. Marcação de COX-2. Objetiva 20x.....	73
Figura 34 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de COX-2. Objetiva 4x.....	74
Figura 35 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de COX-2. Objetiva 20x.....	74
Figura 36 - Fotomicrografia de tumor mamário canino. Marcação de COX-2 (controle positivo). Objetiva 4x.....	75
Figura 37 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de p53. Objetiva 4x.....	76
Figura 38 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Expressão de p53. Objetiva 4x.....	76
Figura 39 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Expressão de p53. Objetiva 4x.....	77
Figura 40 - Carcinoma de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Expressão de p53. Objetiva 20x.....	77
Figura 41 - Fotomicrografia de melanoma canino. Marcação de p53 (controle positivo). Objetiva 4x.....	78
Figura 42 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de pancitoqueratina AE1/AE3. Objetiva 4x.....	79

Figura 43 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de pancitoqueratina AE1/AE3. Objetiva 4x.....79

Figura 44 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Vimentina. Objetiva 4x.....80

Figura 45 - Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de vimentina. Objetiva 4x.....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas das lesões de pele com carcinoma em células escamosas cutâneo em cães.....	52
Tabela 2 - Características microscópicas da pele com carcinoma de células escamosas em cães.....	58
Tabela 3 - Análise quantitativa da expressão de Ki-67 e 5 metilcitosina em ceratose actínica e carcinoma de células escamosas em cães.....	61
Tabela 4 - Análise qualitativa de E-caderina, COX-2, p53, pancitoqueratina AE1/AE3 e vimentina em carcinoma de células escamosas e ceratose actínica em cães.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

5mc	5 metilcitosina
6-4 PPs	6-4 photoproducts
C4	Carbono 4
C5	Carbono 5
C6	Carbono 6
CA	Ceratose actínica
CCE	Carcinoma de células escamosas
COX	Ciclo-oxigenase
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dr.	Doutor
Ecad	E-caderina
et al.	E outros
H&E	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
PAS	Periodic acid-Schiff
Prof.	Professor
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
v.	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm

Centímetro

μm

Micrômetro

nm

Nanômetro

RESUMO

Zanini DA. *Estudo comparativo dos aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e do carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal de caninos domésticos* [Dissertação]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Os tumores cutâneos e subcutâneos em cães representam um terço das neoplasias nessa espécie. O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna com origem no epitélio estratificado escamoso da pele e de outras superfícies mucosas. A etiologia do CCE em cães não é bem definida, porém é descrito que a exposição aos raios solares é um importante fator para seu desenvolvimento. O CCE, frequentemente, é precedido pela ceratose actínica (CA). Este trabalho tem como objetivo comparar aspectos clínicos, morfológicos e moleculares da ceratose actínica e carcinoma de células escamosas da pele da região abdominal ventral de cães. Foram coletadas dez amostras de pele apresentando CCE e 9 amostras de pele apresentando CA da região abdominal ventral de caninos domésticos. As amostras foram fixadas em formol a 10%, e rotineiramente processadas para inclusão em parafina. Os cortes histológicos de 5µm foram submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina, para análise histopatológica, e às marcações, por imuno-histoquímica, de E-caderina, p53, Ciclo-oxigenase-2, pancitoqueratina AE1/AE2, vimentina, 5 metilcitosina e Ki67. As expressão de E-caderina, p53, ciclo-oxigenase-2, pancitoqueratina AE1/AE e vimentina foram avaliadas qualitativamente nas 9 amostras de CA e 10 amostras CCE, respectivamente. A metilação global do DNA e a proliferação celular (Ki67) foram quantificadas nos cortes histológicos de CA e CCE por meio da contagem de núcleos de células epiteliais marcados positiva ou negativamente. Os dados foram analisados por meio de testes uni e multivariados. Os cães machos da raça American PitBull Terrier de pelagem branca foram os mais acometidos pela CA e CCE, com média de idade de 8,1 e 8,4 anos, respectivamente. Não houve associação significativa na expressão de p53, COX-2 e vimentina na CA e CCE. Houve aumento no número de células com o núcleo marcado positivamente para Ki-67 e 5 metilcitosina em CCE comparado a CA. Observou-se, também, marcação heterogênea de Ecaderina em CCE. Constatou-se também diminuição na expressão de pancitoqueratina AE1/AE3 quando há invasão linfática e maior expressão de 5 metilcitosina em cães mais idosos, no CCE. Estes achados

sugerem que há diferenças entre CA e CCE em relação aos parâmetros estudados, que condizem com a transformação maligna da afecção.

Palavras chave: carcinoma; pele; neoplasias; proteína supressora de tumor P53; caderinas; luz solar; modelo animal

ABSTRACT

Zanini DA. *Comparative study of the clinical, morphological and molecular aspects of actinic keratosis and squamous cell carcinoma in the skin of the abdominal ventral region of domestic canines* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Cutaneous and subcutaneous tumors in dogs account for a third of neoplasms in this species. Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasm that originates in the stratified squamous epithelium of the skin and other mucosal surfaces. The etiology of SCC is not well defined, however it is described that exposure to the sunlight is an important factor for its development. SCC is often preceded by actinic keratosis (AK). This work aims to compare clinical, morphological and molecular aspects of actinic keratosis and squamous cell carcinoma of the skin of the ventral abdominal region of dogs. Ten samples of SCC and 9 skin samples showing AK of the ventral abdominal region of domestic canines were collected. As samples were fixed in 10% formaldehyde, and routinely processed for inclusion in paraffin. Histological sections of 5µm were submitted to staining of Hematoxylin and Eosin for histopathological analysis, and to immunohistochemistry of E-cadherin, p53, Cyclooxygenase-2, pancytokeratin AE1/AE2, vimentin, 5 methylcytosine and Ki-67. The expression of E-cadherin, p53, cyclooxygenase-2, pancytokeratin AE1 / AE and vimentin were qualitatively evaluated in the 9 AK samples and 10 SCC samples, respectively. Overall DNA methylation and cell proliferation (Ki67) were quantified in the histological sections of AK and SCC by counting nuclei of positively or negatively labeled epithelial cells. The data were analyzed by means of uni and multivariate tests. Male dogs of the American PitBull Terrier breed were the most affected by AK and SCC, with an average age of 8.1 and 8.4 years, respectively. There was no significant association in the expression of p53, COX-2 and vimentin in CA and CCE. There was an increase in the number of cells with the nucleus positively labeled for Ki-67 and 5 methylcytosine in CCE compared to CA. There was also a heterogeneous labeling of Ecaderin in CCE. It was also observed a decrease in the expression of pancytokeratin AE1/AE3 when there is lymphatic invasion and greater expression of 5 methylcytosine in older dogs in the ECC. These findings suggest that there are differences between CA and SCC in

relation to the studied parameters, which are consistent with the malignant transformation of the disease.

Descriptors: carcinoma; skin; neoplasms; tumor suppression protein P53; cadherins; sunlight; animal model

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias epiteliais são compostas por células epiteliais alteradas geneticamente e por uma variedade de células normais como células endoteliais, inflamatórias e fibroblastos. A progressão maligna se dá por meio de eventos intrínsecos, como a ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor e fatores extrínsecos, que está relacionado a mudanças no microambiente que podem favorecer a tumorigênese (Coussens et al., 2000).

Os tumores cutâneos e subcutâneos em cães representam um terço das neoplasias nesta espécie, observou-se um importante aumento na incidência deste tipo de neoplasia nos últimos 30 anos, sendo que, aproximadamente 20 a 30% destes tumores são malignos com uma alta proporção de invasão local e baixo índice metastático. O carcinoma de células escamosas representa cerca de 5% das neoplasias cutâneas em cães, sendo que em 41% dos animais diagnosticados, esta neoplasia acomete a pele (Withrow; Vail, 2007; Mulas et al., 1999; Mortier et al., 2002; Kimura et al., 2007).

O carcinoma de células escamosas é um tumor maligno originário dos ceratinócitos da camada espinhosa da epiderme. A causa primária do carcinoma de células escamosas cutâneo é a exposição solar cumulativa, mas outras causas são descritas, como imunossupressão, inflamação crônica e infecção por papilomavírus em humanos. Os fatores de risco incluem diâmetro da lesão, diferenciação histológica, crescimento rápido, localização anatômica, imunossupressão e etiologia (Kerkelä; Saarialho-Kere, 2003 ; Liu, et al., 2013; Rundhaug; Fischer, 2008; Jonason, et al., 1996)

A ceratose actínica é uma lesão epitelial pré-maligna que pode preceder o carcinoma de células escamosas e, menos frequentemente, o carcinoma de células basais, tornando-se o alvo para prevenção do carcinoma de células escamosas. (Carpenter et al. 2004).

Em cães, as lesões são mais comuns em regiões com menor cobertura de pelos como a região abdominal ventral, face e membros, acometendo principalmente cães de pelagem branca. (Hargis; Thomassen, 1979; North; Banks, 2009).

Tendo em vista que a ceratose actínica precede o carcinoma de células escamosas, estudou-se as possíveis diferenças e correlações nas imunomarcações de p53, Ki-67, E-caderina, 5 metilcitosina, Ciclo-oxigenase-2, pancitoqueratina AE1/AE3 e vimentina nestas duas afecções com o intuito de entender a carcinogênese cutânea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epiderme

A pele é uma barreira mecânica que protege o organismo contra invasões de microorganismos, variações de temperatura e umidade, radiação ultravioleta e de substâncias tóxicas. A epiderme é um tecido epitelial classificado como pavimentoso estratificado queratinizado composto por múltiplas camadas celulares por meio de posição, forma, polaridade, morfologia e diferenciação dos ceratinócitos. As camadas da epiderme são nomeadas da camada mais profunda a mais superficial como: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea (Bogliolo Filho, 2013; Rubin et al., 2006; Robbins; Cotran, 2010).

A camada basal é uma camada única de células colunares e cubóides que separa a epiderme da derme. É composta principalmente por ceratinócitos que estão em constante divisão. Figuras de mitose e apoptose podem ser observadas nesta camada. Os ceratinócitos basais podem ancorar a epiderme e ter função reparativa e proliferativa (Miller Jr; Campbell; Griffin, 2013; Jones; Hunt; King, 2000).

A camada espinhosa é composta por células que tiveram origem na camada basal e é muito espessa nos coxins, plano nasal e junções mucocutâneas. As células são poliédricas a cubóides, levemente achatadas. Os ceratinócitos estão unidos por desmossomos nos quais se inserem filamentos intermediários da família das queratinas que fazem parte do citoesqueleto. Os desmossomos dos ceratinócitos vizinhos se unem

por meio de proteínas transmembrânicas da família das caderinas (Rubin et al., 2006; Miller Jr; Campbell; Griffin, 2013; Jones; Hunt; King, 2000).

A camada granulosa é composta por células alongadas e estreitas repleta de grânulos basofílicos. As células da camada granulosa já estão em processo de queratinização.

A camada lúcida é totalmente queratinizada, compacta e contém uma camada fina de células mortas. Nesta camada, as células são desprovidas de núcleos e mostram aspecto filamentoso e homogêneo. Ela difere da camada córnea por ser rica em proteínas ligadas a lipídios. A camada lúcida é bem desenvolvida nos coxins, menos desenvolvida no plano nasal e, ausente, nas demais áreas de pele normal.

A camada córnea é a mais externa da diferenciação de ceratinócitos. É uma zona de multicamadas de corneócitos anucleares e achatados, estruturados por uma matriz extracelular lipídica. A descamação gradual é normalmente balanceada com a proliferação das células basais, que mantêm uma espessura epidermal constante. Os corneócitos contêm uma variedade de umectantes e protetores solares naturais que são sintetizados por proteínas e apresentam uma grande importância na proteção da pele. (Miller Jr; Campbell; Griffin, 2013; Blazquez, 2016; Sampaio; Rivitti, 2001; MULLER; Kirk; Scott, 1985; Scott; Miller Jr; Griffin, 2001).

A epiderme é renovada ao longo da idade adulta por meio da proliferação e diferenciação do seu principal constituinte que são os ceratinócitos. O processo do ciclo de renovação da epiderme se dá por meio de um conjunto de células progenitoras que residem na membrana basal da epiderme, mas diferem das células troncos desta mesma região. Estas células progenitoras apresentam um grande potencial de proliferação simétrica e assimétrica, sendo que algumas células permanecem proliferativas e, outras, se diferenciam.

A renovação normal da epiderme envolve vias de sinalização que governam a proliferação, término do ciclo celular e diferenciação, que gera a formação da camada corneificada. (Suter et al., 2009; Niessen; Gottardi, 2008).

2.2 Ceratose actínica

A ceratose actínica (CA) é uma lesão pré-neoplásica que é bem descrita no homem, sendo que 60% deste tipo de lesão evoluem para o carcinoma de células escamosas. A incidência desta afecção está associada à localização geográfica, clima, baixa latitude, alta altitude e exposição solar prolongada. (Carpenter et al., 2004; Lebwohl, 2003; Rigel; Rigel; Rigel, 1999; Berman et al., 2006; Ortonne, 2002; Gross; Ihrke; Walder; Affolter, 2005).

As lesões actínicas podem ser múltiplas ou únicas e há uma grande variação em sua extensão, caracterizam-se por serem eritematosas e com a cronicidade podem evoluir para eritema focal com crostas e descamação, pápulas, máculas mal definidas e em forma de placa. Piodermite secundária com furunculose actínica e presença de comedões são achados comuns (Carpenter et al., 2004; Stockfleth; Kerl, 2006; Berman et al., 2006).

O termo ceratose actínica refere-se à descrição clínica de uma doença que possui diagnóstico histopatológico. As alterações epidérmicas são variáveis e dependem do estágio da doença. Os principais achados são hiperplasia epidermal irregular e displasia sem invasão da membrana basal. Transição suave entre lesões leves e marcadas da epiderme hiperplásica e epiderme saudável. Discreta perda da polaridade celular e da

arquitetura normal, confinadas a camada basal e espinhosa. Citoplasma levemente mais claro que a epiderme normal, leve a moderada atipia nuclear e discreto aumento no número de figuras de mitoses e células apoptóticas. A epiderme é comumente hiperqueratótica com perda da camada córnea ou mais compacta, e presença de paraceratose e hiperkeratose. Quando há penetração da derme, significa que o carcinoma de células escamosas já está instalado, o que pode ocorrer em lesões avançadas. (Alam; Ratner, 2001; Costa, 2009; Stockfleth; Kerl, 2006; Anwar et al., 2004; Butani; Arbesfeld; Schwartz, 2005; Rowert-Huber et al., 2007).

Carpenter et al. (2004), avaliaram as alterações morfológicas celulares em pele normal, pele exposta a radiação solar e ceratose actínica, em humanos, e observaram irregularidade e aumento do tamanho nuclear na ceratose actínica comparado com a pele normal e com dano solar.

2.3 Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna com origem no epitélio estratificado escamoso da pele e de outras superfícies mucosas. A etiologia do carcinoma de células escamosas em cães não é bem definida, porém é descrito em literatura que a exposição aos raios ultravioletas é um importante fator ao desenvolvimento desta neoplasia. O carcinoma de células escamosas acomete normalmente cães de pelagem branca e animais de meia idade, sendo as raças Dálmata, American PitBull Terrier, Dogue Alemão, Beagle, Bull Terrier, Whippet e Boxer as mais acometidas. As lesões se concentram em regiões com menor cobertura de pelos,

como, face interna de membros, plano nasal, pina de orelhas e abdome, as lesões podem ser crostosas, ulcerativas, placas eritematosas, disseminadas ou localizadas. O carcinoma de células escamosas, frequentemente, é precedido pela ceratose actínica (North; Banks, 2009; Costa, 2009; Carvalho, 2008. Almeida et al., 2001). À interpretação histopatológica do carcinoma de células escamosas, observa-se espessamento da epiderme, paraceratose e ortoceratose. Há uma perda de maturação ordenada com presença de ceratinócitos atípicos em toda espessura total da epiderme. Os ceratinócitos atípicos podem ser eosinofílicos ou, às vezes, pálidos ou vacuolizados, no citoplasma observa-se espirais paraceratóticas devido a agregados de células neoplásicas. Evidencia-se um aumento do número de mitoses atípicas e disqueratose, ou ceratinócitos necróticos em toda a epiderme. Os núcleos dos ceratinócitos estão pleomórficos, muitas vezes grandes e hipercromáticos (Huber et al., 2007; Robins; Cotran, 2010).

2.4 Exposição solar

Dentre os fatores ambientais que podem gerar danos ao DNA, a radiação solar é a mais conhecida. A camada de ozônio bloqueia a entrada de ondas menores que 280nm, que são as mais lesivas aos seres vivos (Schuch et al., 2008).

A luz solar é dividida em três partes: luz ultravioleta (5%), luz visível (45%) e luz infravermelha (50%) (Figura 1) (Svobodova, 2006).

Fonte: Svobodova, 2006.

Figura 1 - Composição da luz solar

A radiação ultravioleta é descrita como o fator de risco mais importante no desenvolvimento de neoplasias cutâneas, e é dividida de acordo com o comprimento de onda: UVA (320-400nm), UVB (280 a 320nm) e UVC (200 a 280nm) (figura 1). A radiação UVC é totalmente absorvida pela camada de ozônio e parte da UVB também é absorvida, restando apenas a UVA e parte da UVB compostas por suas ondas de maior comprimento. A luz solar que alcança a superfície terrestre é composta por 95% de radiação UVA e 5% de radiação UVB. A exposição da pele aos raios ultravioletas provoca consequências imunológicas locais e sistêmicas e altera as funções e características morfológicas das células de Langerhans, além de influenciar a produção de citocinas na pele. O reconhecimento e processamento prejudicado de antígenos e uma resposta imune deficiente podem influenciar a susceptibilidade a neoplasias e infecções cutâneas (Figura 2). O estresse foto-oxidativo provocado por raios UVA, indiretamente causa mutações características no DNA. Por outro lado, a radiação UVB e UVC age diretamente na formação de ciclobutanos de pirimidina (CPDs) e fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). A formação de CPDs ocorre quando as bases de pirimidina da mesma banda de DNA absorvem a energia da radiação UV e ocorre uma ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases (Figura 3). No caso do 6-4PPs há uma ligação covalente entre o C4 e C6 das bases da mesma banda (Figura 4). A ausência de mecanismos adequados de reparação nestas alterações no

DNA representa o início das mutações nos ceratinócitos que podem progredir para ceratose actínica e carcinoma de células escamosas. (Stockfleth; Kerl, 2006; Costa, 2009; Papadogiannakis et al., 2008; Elisson et al., 2008; Liu, et al., 2013; Pradhan et al., 2008; Jonason et al., 1996; Ortonne, 2002; Acatürk; Edington, 2005).

Fonte: Monteiro, 2010.

Figura 2 - Penetração da radiação UV na pele

Fonte: Giordano et al. (2016)

Figura 3 - Formação de ciclobutanos de pirimidina. Ligação covalente entre os átomos de carbono C5 e C6 de ambas as bases

Fonte: Giordano et al. (2016)

Figura 4 - Formação de fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona (6-4PPs). Ligação covalente entre o C4 e C6 das bases da mesma banda

Rigel et al. (1999) apresentou um modelo para mensurar a intensidade da radiação UVB em diferentes latitudes e altitudes, sugerindo que há um aumento de 8% a 10% da intensidade da radiação ultravioleta a cada mil pés de elevação e aproximadamente 3% de aumento a cada grau de latitude.

A exposição cutânea aos raios ultravioletas gera um estágio de hiperproliferação dos ceratinócitos como compensação as células que sofreram apoptose e como uma forma de proteger as células da camada basal contra a exposição solar. As células com DNA danificados são mais resistentes à apoptose e podem continuar a acumular alterações genéticas. Estas alterações são observadas tanto na ceratose actínica quanto no carcinoma de células escamosas em humanos. (Cockerell, 2003; Elisson et al., 2008; Pradhan et al., 2008; Rundhaug; Fischer, 2008, Ortonne, 2002; Keller et al., 2007; Butani; Arbesfeld; Schwartz, 2005; Chang et al., 2014; Florence et al., 2015).

Segundo Brash et al. (1991) três dos 24 CCE cutâneos em humanos avaliados apresentaram mudança dupla de base CC-TT, alteração específica causada por radiação UV e 100% das mutações que ocorreram na sequência de dipirimidinas, foram

predominantes em transições C-T. Em mutações causadas por UVC e UVB, a frequência de transições C-T é de 62% e de substituição de bases CC-TT é de 23%.

2.5 p53

A proteína nuclear p53 é expressa pelo gene p53, também conhecido como “guardião do genoma”. Trata-se de um gene supressor de tumor, responsável por inibir as transformações malignas em muitos tecidos, por meio da parada do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Vousden; Lane, 2007). A carcinogênese cutânea é explicada pelo dano ao DNA pela exposição à radiação solar que frequentemente é detectada pela mutação do gene p53 (Figura 5), sua função torna-se alterada e sua meia-vida prolongada (aproximadamente 2 horas), levando ao acúmulo intranuclear tornando-se detectável por imuno-histoquímica (Brash et al. 1991; Soussi; Bérout, 2001).

Fonte: Ratushny et al., 2012.

Figura 5 - Ação da radiação UVB em mutações do p53 acarretando falha na apoptose e proliferação celular

Em um estudo realizado por Carpenter et al. (2004), em humanos, em que foi avaliado a expressão de p53 em pele normal, pele exposta a radiação solar e ceratose actínica, observou-se que a marcação de p53 foi mais evidente na pele com dano solar e na ceratose actínica comparada a marcação fraca na pele normal.

Segundo Nelson et al. (1994) cerca de 69% dos carcinomas de células escamosas e 53% das ceratoses actínicas apresentam mutação no p53, resultados semelhantes aos relatados por Brash et al. (1991) em CCE em humanos. Jonason et al. (1996) afirmaram que 4% dos ceratinócitos de pele normal expostos a luz solar contém p53 mutado, sendo que a localização mais afetada é composta de pele de locais mais expostos como pálpebra e região peri-labial e auricular, porém há mutação do gene P53 em locais

menos expostos como os seios, região interna de braços, parte superior das costas, abdome e coxas.

Florence et al. (2015) realizaram um estudo com a expressão de p53 e Ki-67 em ceratose actínica, carcinoma de células escamosas superficialmente invasivo e carcinoma de células escamosas invasivo em humanos, houve marcação em todos os tipos de afecções, no entanto, não observou-se significância na contagem de marcações entre os tipos de lesões ($p=0,956$). Houve significância positiva na correlação de p53 e Ki-67 em CCE invasivo ($p=0,0034$).

O desenvolvimento das neoplasias cutâneas está relacionado à expressão anormal de alguns genes, portanto, apenas a mutação do gene p53 pode não ser suficiente para a transformação maligna, segundo. Stelkovics et al. (2013) houve uma maior expressão de p53 em carcinoma de células escamosas e carcinoma de células basais comparada à pele normal em humanos, porém não há diferença de expressão nos subtipos de carcinoma cutâneo e em variações de grau histológico, sugerindo que há uma contribuição semelhante no desenvolvimento destas duas neoplasias e de sua agressividade.

Em um estudo com camundongos transgênicos, deficientes em p53, observou-se o desenvolvimento de múltiplos tumores (Li et al., 1995) e em outro estudo foi possível afirmar que camundongos nulos para o gene p53 apresentam um aumento na sensibilidade cutânea para o desenvolvimento de tumores de pele induzidos por radiação UVB. Além disso, observou-se uma pequena incidência de mutações no gene do p53 em camundongos com tumores de pele induzidos por radiação UVA (14%) comparado com radiação UVB (90%) (Li et al., 1998).

Fravot et al. (2009) avaliaram a expressão de p53 em ceratose actínica em felinos domésticos e observaram uma marcação nuclear forte e localizada na camada

basal e suprabasal da CA, já Stelkovic et al. (2013) observaram a expressão de p53 na camada basal de ceratinócitos indiferenciados.

Em um estudo realizado para avaliar a expressão de p53 em neoplasias de caninos domésticos, felinos domésticos, equinos, bovinos e ovinos, observou-se que no CCE em cães, não houve marcação de p53 com nenhum dos anticorpos utilizados e foi demonstrado uma marcação citoplasmática não específica (Albaric et al. 2001). Murakami et al. (2000), Teifke e Löhr (1996) e Gamblin et al. (1997) demonstraram expressão nuclear de p53 em CCE canino, em aproximadamente 30%, 29% e 69%, respectivamente. Sendo que Gamblin et al. (1997) relatou também marcação citoplasmática em uma amostra de CCE em cães.

Alguns estudos observaram a expressão de p53 citoplasmática em diferentes tipos de tumor incluindo câncer colorretal, câncer de mama e neuroblastoma, sugerindo que este tipo de marcação está associado com a proteína *wild-type* e a perda de sua função. O p53 é excluído do núcleo devido a um sequestro citoplasmático ou por hiperatividade nuclear. A acumulação de p53 citoplasmática torna-se um fator de prognóstico desfavorável (Jansson et al., 2001; Green; Kroemer, 2009; O'Brate; Giannakakou, 2003).

2.6 Ki-67

A proteína Ki-67 é muito estudada como um indicador de atividade proliferativa. O Ki-67 está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 e está confinada à camada basal na epiderme (Watanabe et al., 2010).

Carpenter et al. (2004) realizaram um estudo em humanos, em que foi avaliado a proliferação celular por meio da marcação de Ki-67 em pele normal, pele exposta a radiação solar e ceratose actínica. A expressão de Ki-67 na ceratose actínica estava presente em todas as camadas da epiderme, diferente da marcação na pele normal e com dano solar, em que a expressão estava localizada na camada basal. Pereira et al. (2016) observou uma expressão forte de Ki-67 em mucosa oral normal, comparada a expressão em CCE e carcinoma de células basais orais.

Silva et al. (2007) realizaram um estudo em humanos comparando a proliferação celular, por meio da marcação imuno-histoquímica do Ki-67, em ceratose actínica em diferentes graus de elastose solar (grau I >30% de degradação de colágeno, grau II 30%-60% e grau III < 60%) e concluíram que o número de células positivas foram maiores em lesões de grau II e III, comparado ao grau I ($p=0,018$), porém observaram uma diminuição na intensidade da marcação em lesões grau III quando comparado ao grupo I e II ($p=0,049$). A distribuição das marcações estava presente na camada basal em lesões de grau I, e em grau II e III, na camada basal e em camadas mais superficiais.

Em um estudo em humanos observou-se a expressão de Ki-67 na camada basal e na primeira camada suprabasal em epiderme normal e em ceratose actínica, no carcinoma de células escamosas a marcação estava presente na periferia das ilhas tumorais do CCE. O índice de proliferação celular foi mais evidente no CCE (Caldwell; Hobbs; Mckee, 1997). Um resultado parecido foi descrito por Lan et al. (2014) que observou a expressão do Ki-67 em epiderme normal e em CCE em humanos, além de uma marcação mais evidente em carcinoma de células escamosas pouco diferenciado, indicando que o Ki-67 pode ser um marcador de diferenciação em CCE, diferente do que foi descrito por Mohtasham et al. (2013), que não observaram correlação entre a

expressão de Ki-67 e a diferenciação histológica em carcinoma de células escamosas oral em humanos.

Stelkovics et al. (2013) realizaram um estudo com CCE, carcinoma de células basais, ceratose actínica e epiderme normal em humanos e concluíram que há aumento na expressão de Ki-67 em CCE comparada a lesões pré-neoplásicas e pele sem alterações, porém sem significância.

Poggiani et al. (2012) realizaram um estudo sobre a expressão de Ki-67 em carcinoma de células escamosas e ceratose actínica em cães, porém não foi observado diferença na proliferação celular nestas duas afecções, como descrito também por Florence et al. (2015) em humanos.

2.7 E-caderina

As caderinas são moléculas de adesão que regulam a junção célula-célula. A E-caderina é expressa em todos tecidos epiteliais. Durante a proliferação celular de células neoplásicas ocorre uma diminuição na expressão de E-caderina que facilita a migração, invasão e metástase (Pereira et al., 2016; Wu; Zhang; Qin, 2014).

Em dois estudos realizados com carcinoma de células escamosas oral em humanos avaliou-se a expressão de E-caderina em mucosa normal e neoplásica. A marcação de E-caderina na mucosa normal era forte e contínua, diferente do que foi observado nas células neoplásicas, onde a expressão era mais fraca e descontínua (Pereira et al., 2016; Sridevi et al., 2015).

Koseki et al. (1999) realizaram um estudo observando a expressão de E-caderina em carcinoma de células escamosas cutâneo em humanos, em pele normal a expressão de E-caderina era forte, já nos CCE 29,1% apresentavam expressão forte e 70,9% expressão fraca ou ausente. Em casos sem metástase em linfonodo, a expressão de E-caderina foi forte em 43,8% e fraca ou ausente em 56,2%. Entretanto, nos casos com metástase em linfonodos 0,7% demonstraram expressão forte e 91,3% marcação fraca ou ausente. Além disso, concluíram que a redução da expressão de E-caderina é diretamente proporcional ao grau de diferenciação histológico do CCE, porém não há relação com o tamanho do tumor. Resultados semelhantes foram descritos por Jiang et al. (2015) em carcinoma de células escamosas em cavidade oral.

Em um estudo realizado por Wu et al. (2014) observou-se uma hipermetilação do gene da E-caderina em carcinoma de células escamosas comparada com pele normal em humanos, sugerindo uma supressão da expressão gênica da E-caderina. A hipermetilação foi mais evidente em tumores de baixa diferenciação e metástase em linfonodos.

2.8 5 metilcitosina (5mc)

O desenvolvimento de neoplasias cutâneas ocorre por meio de uma série de eventos genéticos e epigenéticos. A epigenética trata-se de mudanças hereditárias no fenótipo que não alteram a sequência de bases do DNA. As alterações epigenéticas envolvem variações na metilação do DNA, estrutura de cromatina ou microRNA que podem modificar a expressão gênica. A hipermetilação é conhecida como um

importante mecanismo de inativação da expressão de genes supressores de tumor e a hipometilação pela ativação de proto-oncogenes durante o desenvolvimento do câncer. A metilação do DNA na posição 5' da citosina é o mecanismo epigenético que pode ser herdado sem alteração na sequência de DNA. A fração de DNA metilada é reconhecida através de anticorpo 5 metilcitosina (Laird; Jaenisch, 1996; Vaid et al., 2012; Hernandez-Blazquez et al., 2000; Breiling; Lyko, 2015; Känel; Huber, 2013).

Segundo Nandakumar et al. (2011) ocorre hipermetilação global do DNA em pele exposta a radiação ultravioleta, levando ao silenciamento de genes supressores em neoplasias cutâneas induzidas por radiação UVB em camundongos. Prasad; Katiyar (2013) observaram uma hipermetilação global do DNA em camundongos expostos a radiação ultravioleta, e após o tratamento com 5-Aza-dc, inibidora da DNA metiltransferase, a expressão de 5mc foi menor.

Em um estudo realizado por Lahtz et al. (2014) não foi observado aumento na metilação global do DNA em pele humana exposta a luz solar, sugerindo que as alterações na metilação estão associada à exposição solar crônica.

Vaid et al. (2012) realizaram um experimento para avaliar a metilação global do DNA em de células de carcinoma de células escamosas e células epiteliais normais, o nível de metilação global do DNA foi 3 vezes maior em células de CCE comparadas a células normais.

2.9 Ciclo-oxigenase 2

As ciclo-oxigenases (COX) são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (Figura 6). Existem duas isoformas de ciclo-oxigenases a COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa em muitos tecidos e está correlacionada a processos fisiológicos e a COX-2 é um marcador inflamatório e está expressa em neoplasias, estimula a divisão celular e angiogênese e inibe a apoptose, por meio da ativação do bcl-2.

Fonte: Sobolewski et al., 2010.

Figura 6 - Conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas por ação da COX-2

A COX-2 é a isoforma normalmente expressa após exposição solar (Fosslien, 1999; Zhan, 2007), devido a isso muitos estudos são desenvolvidos nesta linha de pesquisa, em um experimento realizado em camundongos *wild-type* e com mutação em COX-2 irradiados com UVB, houve uma baixa incidência de CCE em camundongos

mutados comparados aos *wild-type* (Elmets et al., 2014). Em cultura de ceratinócitos humanos expostos a radiação UVB, houve um aumento na expressão de prostaglandinas, sugerindo um aumento na expressão de COX-2, estes ceratinócitos expostos a radiação UVB por 24 horas, apresentaram um aumento de seis vezes na expressão de COX-2, em 12 horas de exposição, apresentaram 12 vezes mais a identificação de mRNA para COX-2. Para validar os resultados obtidos, foram realizados imuno-histoquímica em CCE, CA e pele normal, concluindo que a expressão de COX-2 foi evidente no carcinoma de células escamosas e na ceratose actínica e ausente na pele normal (Buckman et al. 1998), resultado também descrito em cães por Poggiani et al. (2012) e em cães e gatos por Bardagi et al. (2012). Athanassiadou et al. (2013) observaram marcação fraca ou ausente em ceratose actínica e moderada a forte em CCE humano.

Em um estudo realizado por Yalçin et al. (2012) observaram que extensão da expressão de COX-2 em carcinoma de células escamosas e ceratose actínica em humanos foi semelhante, não foi observada correlação entre a diferenciação tumoral e a expressão de COX-2, também descrito por Ciorte et al. (2015). Já Sivriköz et al. (2014) relataram aumento na expressão de COX-2 em CCE invasivo.

Fisher et al. (2007) realizaram um estudo com camundongos irradiados com UVB e avaliaram a expressão de COX-2, por meio de Western blot, em CCE e pele normal. A mesma análise foi realizada em humanos e afirmaram que a COX-2 foi pouco detectada em pele normal e evidente em CCE, em humanos e camundongos (Lee et al. 2013).

Em uma meta-análise realizada por Shujiao et al. (2017) em que foi avaliada expressão de ciclo-oxigenase-2 em CCE de pacientes chineses, afirmaram a forte expressão de COX-2 em CCE e a correlação com o tipo histológico.

A forte expressão de COX-2 em CCE cutâneo em cães e a ausência de expressão em pele normal foi descrita por Almeida et al. (2001) e Milanta et al. (2016), a expressão de COX-2 não mostrou associação com metástase em linfonodo e graduação histológica, porém foi correlata na progressão da doença ($p < 0,005$), sugerindo que COX-2 pode estar envolvida na transformação maligna cutânea em caninos domésticos

2.9.a Pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina

O citoesqueleto é uma rede proteica e é constituído pelos filamentos intermediários que são responsáveis pela estrutura tridimensional da célula. Existem três tipos de filamentos intermediários: a vimentina e relacionados (vimentina presente nas células mesenquimais), neurofilamentos e as citoqueratinas encontradas no epitélio (Almeida Jr., 2004).

Anticorpos anti-Pancitoqueratinas AE1/AE3 reagem com várias citoqueratinas humanas e caninas, sendo os mais usados para marcação de tumores epiteliais (Pelster et al. 2016; Ferreira et al., 2015); já a vimentina, é utilizada para marcação e caracterização de neoformações de origem mesenquimal. Há relatos de aumento na expressão de vimentina e baixa expressão de citoqueratina em tumores epiteliais de alto grau, condizendo com a transformação epitélio-mesenquima (Margaritescu, et al. 1999-2004; Kalluri et al., 2009; Verneuil et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi comparar as características clínicas, histopatológicas e algumas características moleculares da ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região abdominal ventral de caninos domésticos.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever os aspectos físicos das alterações da ceratose actínica na pele da região abdominal ventral de caninos domésticos;
- Quantificar a proliferação celular pela marcação do Ki-67 por imuno-histoquímica nos casos de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas da pele da região ventral abdominal ventral de caninos domésticos;
- Avaliar por imuno-histoquímica a expressão do p53 na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal dos caninos domésticos;
- Avaliar por imuno-histoquímica a expressão de E-caderina na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal dos caninos domésticos;

- Avaliar por imuno-histoquímica a expressão de Cox-2 na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal dos caninos domésticos;
- Quantificar a metilação global do DNA por meio da marcação da 5-metil citosina por imuno-histoquímica e quantificação em sistema de análise de imagem na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal dos caninos domésticos.
- Avaliar por imuno-histoquímica a expressão de pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas na pele da região ventral abdominal dos caninos domésticos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e coleta de amostras

Os blocos parafinados de pacientes caninos com diagnóstico de carcinoma de células escamosas e ceratose actínica foram obtidos do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Anhanguera de São Paulo.

Foram obtidos 10 blocos parafinados de carcinoma de células escamosas e 9 blocos parafinados de ceratose actínica da região abdominal ventral de caninos domésticos.

Os cães foram incluídos na pesquisa após autorização e consentimento de todos os proprietários. Os prontuários dos cães foram analisados em relação à raça, sexo, idade, característica da lesão, topografia das lesões e prognóstico da doença (protocolo CEUA FM/USP: 051/14, protocolo CEUA FMVZ/USP: 9596111213)

4.2 Análise microscópica

Após a confecção das lâminas coradas com H&E, as amostras foram classificadas em ceratose actínica ou carcinoma de células escamosas. O diagnóstico destas afecções foi confirmado por três patologistas (Lilian Rose Marques de Sá, Fabrizio Grandi, Kátia Cristina Kimura). Os critérios histopatológicos utilizados foram

baseados na descrição de GROSS et al. (2005) para estabelecer o diagnóstico de ceratose actínica ou CCE, e a classificação deste último de acordo com o grau histológico.

4.3 Técnica imuno-histoquímica (IHQ)

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada de acordo com o protocolo do VetMol - Patologia Molecular Veterinária Diagnóstico e Pesquisa, localizado na cidade de Botucatu, São Paulo. Foram obtidos cortes de 4µm de espessura. Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em sequências de álcoois e água deionizada. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (pH 6,0) em panela Pascal (model S2800, DakoCytomation-Carpinteria, CA), resfriamento até a temperatura ambiente. Após, lavagens com água deionizada, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (Protein Block pronto para uso, Peroxide Block, Cell Marque, 925B-09). Seguiu-se lavagem em água deionizada. Solução tampão TBS (Protein block serum-free, Dako, X0909). As lâminas foram incubadas *18 horas* em câmara úmida a 4°C, com anticorpo primário diluído em albumina bovina (BSA) e azida sódica. Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS (5mcg de tween 20) por 5 minutos. Seguiu-se incubação com Polímero Histofine, 414154F (sistema de detecção por polímero). Em seguida foram realizadas 3 lavagens em PBS (500µl de tween 20), por 5 minutos cada. Seguiu-se revelação com Diaminobenzidina (1 gota DAB + 1ml diluente), observando a coloração e lavagem com água deionizada. A contra coloração foi feita

com Hematoxilina de Harris. Seguiu-se diafanização em sequência de álcoois e xilol e montagem das lâminas.

- anti-Caderina-E (*DAKO clone NHC-38 – 1:50*);
- anti-Ki-67 (*DAKO clone MIB-1 – 1:50*);
- anti-5-metil citosina (*GeneTex - 1:300*);
- anti-p53 (*Santa Cruz Biotechnology clone BP 53. 122, sc-73566 - 1:50*);
- anti-COX-2 (*DAKO clone Cx294 - 1:50*);
- anti-pancitoqueratina AE1/AE3 (*Invitrogen clone AE1/AE3 - 1:200*);
- anti-vimentina (*Invitrogen clone V9- 1:200*).

4.4 Quantificação das marcações por imuno-histoquímica (sistema de escores)

Para permitir a quantificação das marcações obtidas por imuno-histoquímica, todos os cortes histológicos de CCE e CA foram processados nas mesmas reações, respectivamente para cada anticorpo utilizado. A imunorreatividade citoplasmática e a nuclear foram pontuadas separadamente, de acordo com a intensidade da marcação por imuno-histoquímica.

A intensidade da coloração foi avaliada qualitativamente como ausente (-), fracamente positiva (+), moderadamente positiva (+ +), e, fortemente positiva (+ + +) na expressão de E-caderina, p53, COX-2 pancitoqueratina AE1/AE3 e vimentina.

Para as análises estatísticas, as classificações de positividade foram reduzidas a duas categorias: *negativa e positiva*. A categoria *negativa* incluiu a coloração

fracamente positivo e ausente (+,-) e a **positiva** incluiu a marcação moderadamente positiva e fortemente positiva (++,+++). A localização da marcação foi classificada em nuclear, citoplasmática e de membrana. Cada anticorpo foi avaliado de forma duplo-cego. A média de todas as contagens por espécimen foi utilizada como um único valor para a análise estatística. Foi utilizado o software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002, câmera Nikon 800.

4.4.1 Análise quantitativa do Ki-67 e 5 metilcitosina

Para avaliação da imunomarcação de Ki-67 e 5 metilcitosina foi observada a presença ou ausência da marcação acastanhada nuclear nas células da epiderme. Para cada amostra, foram quantificadas no mínimo 2500 células da epiderme (em objetiva de 20x) e dentre elas as células positivamente marcadas pelos anticorpos, respectivamente. Foi utilizado o software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002, câmera Nikon 800.

4.5 Análise estatística

Para realização das análises foi utilizado o software IBM® SPSS® Statistics versão 21. As variáveis quantitativas foram testadas utilizando correlação de Spearman,

as associações de variáveis qualitativas e quantitativas foram testadas através do teste U de Mann-Whitney e a associação entre as variáveis qualitativas foram testadas preferencialmente com teste Exato de Fisher ou teste de Qui-quadrado, quando as tabelas possuíam mais que quatro caselas. Para testar as diferenças entre ceratose actínica e carcinoma foi utilizado o teste de McNemar com distribuição binomial (variáveis qualitativas) e teste de Wilcoxon (variáveis quantitativas). Valores de p menores que 0,05 foram considerados como estatisticamente significante em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 Casos de CA e CCE

Foram coletados 10 blocos parafinados de amostras de carcinoma de células escamosas, a média de idade dos cães diagnosticados foi 8 anos, a média de idade foi de 8,1 anos, sendo 8 machos e 2 fêmeas, 8 da raça American PitBull Terrier, 1 da raça Bull Terrier e um cão sem raça definida. Foram coletados 9 blocos parafinados de ceratose actínica, a média de idade foi de 8,4 anos, sendo 7 machos e 2 fêmea, 7 da raça American PitBull Terrier, 1 da raça Bull Terrier e uma cão sem raça definida .

5.2 Características clínicas dos cães portadores de CA e CCE

As lesões localizavam-se em região abdominal ventral dos cães, região associada a menor cobertura de pelos (Figura 7). As lesões de carcinoma de células escamosas apresentavam-se como placas eritematosas, crostosas e ulceradas, já as lesões de ceratose actínica apresentavam-se como placas eritematosas, pápulas e máculas (Figura 8, Figura 9, Figura 10, Figura 11, Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas das lesões carcinoma em células escamosas cutâneo em cães

Paciente	Raça	Sexo	Idade	Quantidade de lesão	Margens	Tamanho	Linfonodo	Úlcera	Crostras	Forma	Consistência	Evolução clínica
1	Bull Terrier	Fêmea	6 anos	Único	Livre	3-6 cm	Não avaliado	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
2	SRD	Macho	7 anos	Único	Livre	> 6 cm	Não acometido	presente	presente	Placa	Macio	Remissão
3	Pit Bull	Macho	10 anos	Único	Livre	> 6cm	Não acometido	presente	presente	Nodular	Firme	Recidiva
4	Pit Bull	Macho	10 anos	Único	Comprometidas	>6cm	Não avaliado	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
5	Pit Bull	Macho	7 anos	Único	Comprometidas	> 6cm	Não acometido	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
6	Pit Bull	Macho	7 anos	Único	Livre	>6cm	Acometido	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
7	Pit Bull	Macho	7 anos	Único	Livre	>6cm	Acometido	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
8	Pit Bull	Fêmea	9 anos	Único	Livre	<3cm	Não avaliado	presente	ausente	Placa	Firme	Remissão
9	Pit Bull	Macho	5 anos	Único	Livre	>6cm	Não acometido	presente	presente	Placa	Firme	Recidiva
10	Pit Bull	Macho	13 anis	Único	Livre	>6cm	Não avaliado	ausente	ausente	Nodular	Firme	Remissão

Fonte: Hospital Veterinário Anhanguera de São Paulo, 2015.

Figura 7 – Carcinoma de Células escamosas em teto de fêmea da raça American PitBull Terrier com padrão de lesão ulcerativo e eritematoso. Ao redor do teto presença de área de ceratose actínica com eritema e pápulas

Fonte: Hospital Veterinário Anhembi Morumbi, 2016.

Figura 8 – Carcinoma de Células Escamosas e Ceratose Actínica em prepúcio de cão da raça American PitBull Terrier

Fonte: Hospital Veterinário Anhembi Morumbi, 2016.

Figura 9 – Ceratose Actínica em região abdominal ventral de cão da raça American PitBull Terrier

Fonte: Hospital Veterinário Anhembi Morumbi, 2016.

Figura 10 – Pós-operatório de excisão de Carcinoma de células escamosas e ao redor presença de Ceratose Actínica em região abdominal ventral de cão da raça American PitBull Terrier

Fonte: Hospital Veterinário Anhembi Morumbi, 2016.

Figura 11 – Ceratose Actínica e carcinoma de células escamosas em região abdominal e torácica lateral de cão da raça Bull Terrier

5.3 Análise microscópica

As lesões diagnosticadas como ceratose actínica exibiram os seguintes achados histopatológicos na epiderme: hiperplasia, paraceratose, ortoceratose, manutenção da polaridade dos ceratinócitos, pleomorfismo celular moderado (Figura 12). Na derme observou-se proliferação de fibroblastos e áreas de degeneração de colágeno. Ainda nessa localização, as fibras elásticas apresentavam-se degeneradas evidenciando o quadro de elastose solar. Realizou-se coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para visualização de integridade da membrana basal (Figura 13).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2016.
Figura 12 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Epiderme com presença de hiperplasia irregular, hiperkeratose e pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2016.
Figura 13 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Integridade de membrana basal. Coloração: PAS. Objetiva 4x

As lesões diagnosticadas como Carcinoma de Células Escamosas exibiram as seguintes alterações epidérmicas: hiperplasia, hiperqueratose, parakeratose, acantose e abundante proliferação de ceratinócitos neoplásicos invadindo a derme. Essas células neoplásicas, apresentaram-se de tamanho aumentado, arrançadas em ilhas, cordões e trabéculas e moderado a intenso pleomorfismo celular. A relação núcleo/citoplasma estava aumentada (Tabela 2, Figura 14, Figura 15). Foi realizada coloração ácido periódico-Schiff (PAS) para visualização de integridade da membrana basal (Figura 16).

Tabela 2 - Características microscópicas da pele com carcinoma de células escamosas em cães

Paciente	Pleomorfismo celular	Mitoses	Pérolas córneas	Infiltrado Inflamatório	Núcleo	Nucléolo	Invasão Vascular	Invasão Linfática	Classificação histológica
1	discreto	Elevado	Presente	Presente	Redondo	1	Não	Não	Bem diferenciado
2	moderado	Discreto	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Não	Moderadamente diferenciado
3	moderado	Elevado	Presente	Presente	Ovalado	2	Não	Não	Bem diferenciado
4	moderado	Elevado	Presente	Presente	Ovalado	2	Não	Não	Moderadamente diferenciado
5	intenso	Moderado	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Não	Moderadamente diferenciado
6	intenso	Moderado	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Sim	Moderadamente diferenciado
7	intenso	Moderado	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Sim	Moderadamente diferenciado
8	moderado	Elevado	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Não	Bem diferenciado
9	intenso	Moderado	Presente	Presente	Ovalado	1	Não	Sim	Bem diferenciado
10	Discreto	Discreto	Presente	Presente	Ovalado	2	Sim	Não	Moderadamente diferenciado

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2016.
Figura 14 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Hiperplasia, hiperqueratose, paraceratose evidente, pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2016.
Figura 15 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Abundante proliferação de ceratinócitos neoplásicos invadindo a derme, formando ilhas. Intenso pleomorfismo celular. Coloração: H&E. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2016.

Figura 16 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Ausência de delimitação da membrana basal. Coloração: PAS. Objetiva 4x

5.4 Imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em Ceratose Actínica e Carcinoma de Células Escamosas para avaliar a expressão de p53, Ki-67, E-caderina, 5 metilcitosina, COX-2, pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela - 3 Análise quantitativa da expressão de Ki-67 e 5 metilcitosina em ceratose actínica e carcinoma de células escamosas em cães

Paciente	Ki-67				5 metilcitosina			
	Ceratose actínica		Carcinoma de células escamosas		Ceratose actínica		Carcinoma de células escamosas	
	Células totais	Células marcadas	Células totais	Células Marcadas	Células totais	Células marcadas	Células totais	Células Marcadas
1	9875	353 (3,57%)	3503	809 (23,09%)	6789	6633 (97,70%)	7211	6811 (94,45%)
2	15455	1016 (6,57%)	3498	1302 (37,22%)	3593	2150 (59,84%)	11328	11093 (97,92%)
3	10584	783 (7,40%)	1594	201 (12,60%)	3188	3033 (95,13%)	3807	3701 (97,21%)
4	6379	525 (8,23%)	2018	567 (28,09%)	3603	3543 (98,33%)	3442	3386 (98,37%)
5	7877	276 (3,50%)	2918	599 (20,52%)	3938	3508 (89,08%)	5204	5054 (97,11%)
6	9480	875 (9,23%)	1686	457 (27,10%)	4740	3986 (84,09%)	3959	3864 (97,60%)
7	7548	548 (7,26%)	3384	653 (19,29%)	3745	222 (5,93%)	3106	3033 (97,64%)
8	10789	633 (5,86%)	1990	126 (6,33%)	3243	3163 (97,53%)	3419	3374 (98,68%)
9	-	-	2541	718 (28,25%)	-	-	3656	3276 (89,60%)
10	5662	175 (3,09%)	1802	492 (27,30%)	2180	1860 (85,32%)	6502	6448 (99,17%)

Tabela 4 - Análise qualitativa de E-caderina, COX-2, p53, pancitoqueratina AE1/AE3 e vimentina em carcinoma de células escamosas e ceratose actínica em cães

Paciente	E-caderina		COX-2		p53		Pancitoqueratina AE1/AE3		Vimentina	
	CA	CCE	CA	CCE	CA	CCE	CA	CCE	CA	CCE
	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação	Marcação
1	forte	forte	moderada	moderada	Forte	moderada	moderada	Forte	forte	forte
2	forte	forte	Fraca	moderada	moderada	forte	forte	Forte	forte	forte
3	forte	fraca	Fraca	moderada	moderada	moderada	forte	Forte	forte	forte
4	forte	forte	ausente	Fraca	moderada	moderada	moderada	Moderada	forte	forte
5	fraca	fraca	Fraca	moderada	Fraca	forte	moderada	Moderada	forte	forte
6	moderada	moderada	moderada	Forte	Fraca	forte	ausente	Fraca	forte	forte
7	forte	moderada	Fraca	Forte	Fraca	forte	ausente	Fraca	forte	forte
8	fraca	ausente	moderada	Forte	Fraca	forte	forte	Forte	forte	forte
9	-	fraca	-	moderada	-	moderada	-	Fraca	-	forte
10	forte	fraca	ausente	Forte	ausente	forte	forte	Fraca	forte	forte

5.4.1 Ki-67

A imunomarcção de Ki-67 ocorreu nos núcleos dos ceratinócitos da ceratose actínica e carcinoma de células escamosas caracterizada por uma coloração acastanhada (Figura 17, Figura 18, Figura 19, Figura 20). Expressão de Ki-67 no núcleo de linfonodo de cão utilizado como controle positivo (Figura 21).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 17 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Ki-67 em camada basal. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 18 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Ki-67 em camada basal. Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017
Figura 19 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de Ki-67. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 20 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Detalhe. Marcação de Ki-67. Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 21 – Fotomicrografia de linfonodo de cão. Marcação de Ki-67 (controle positivo). Objetiva 4x

5.4.2 E-caderina

A imunomarcção de E-caderina ocorreu na membrana plasmática dos ceratinócitos de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, caracterizada por uma coloração acastanhada (Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25). Imunomarcção de E-caderina em pele de cão como controle positivo (Figura 26).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 22 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de E-caderina. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 23 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de E-caderina.
Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 24 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de E-caderina. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 25 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de E-caderina. Objetiva 20

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 26 – Fotomicrografia de pele canina. Marcação de E-caderina (controle positivo). Objetiva 4x

5.4.3 5 metilcitosina

A imunomarcação de 5 metilcitosina ocorreu nos núcleos dos ceratinócitos de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, caracterizada por uma coloração acastanhada (Figura 27, Figura 28, Figura 29, Figura 30). Imunomarcação de 5 metilcitosina em linfonodo de cão, utilizado com controle positivo (Figura 31).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 27 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 28 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 20

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 29 – Fotomicrografia pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 30 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de 5 metilcitosina. Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 31 – Fotomicrografia de linfonodo de cão. Marcação de 5 metilcitosina (controle positivo). Objetiva 4x

5.4.4 Ciclo-oxigenase-2

A imunomarcação de COX-2 ocorreu no citoplasma dos ceratinócitos de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, caracterizada por uma coloração acastanhada (Figura 32, Figura 33, Figura 34, Figura 35). Imunomarcação de COX-2 em tumor mamário canina como controle positivo (Figura 36).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 32 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de COX-2. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 33 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de COX-2. Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 34 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de COX-2. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 35 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando Carcinoma de células escamosas. Marcação de COX-2. Objetiva 20x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 36 – Fotomicrografia de tumor mamário canino. Marcação de COX-2 (controle positivo). Objetiva 4x

5.4.5 p53

A imunomarcação de p53 ocorreu no citoplasma e núcleo dos ceratinócitos de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, caracterizada por uma coloração acastanhada (Figura 37, Figura 38, Figura 39, Figura 40). Imunomarcação de p53 em melanoma canino como controle positivo (Figura 41).

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 37 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de p53. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 38 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Expressão de p53. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 39 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Expressão de p53. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 40 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Expressão de p53. Objetiva

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 41 – Fotomicrografia de melanoma canino. Marcação de p53 (controle positivo).
Objetiva 4x

5.4.6 Pancitoqueratina AE1/AE3 e Vimentina

A imunomarcção de pancitoqueratina AE1/AE3 ocorreu no citoplasma das células da epiderme (Figura 42, Figura 43) e a vimentina no citoplasma das células da derme (Figura 44, Figura 45) na ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, ambas caracterizada por uma coloração acastanhada.

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 42 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de pancitoqueratina AE1/AE3. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 43 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de pancitoqueratina AE1/AE3. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 44 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando ceratose actínica. Marcação de Vimentina. Objetiva 4x

Fonte: Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada FMVZ/USP, 2017.
Figura 45 – Fotomicrografia de pele de cão apresentando carcinoma de células escamosas. Marcação de vimentina. Objetiva 4x

5.5 Análise estatística

Observou-se aumento da porcentagem de células expressando Ki-67 e 5 metilcitosina em carcinoma de células escamosas comparado a ceratose actínica ($p=0,004$ e $p=0,027$, respectivamente). As demais variáveis não apresentaram associação significativa com a expressão qualitativa de Ki-67 e 5 metilcitosina.

Não houve associação significativa entre as variáveis imuno-histoquímicas qualitativas (p53, COX-2 e vimentina) e ceratose actínica, carcinoma de células escamosas. Observou-se que expressão de Ecaderina heterogênea em CCE comparada a CA ($p=0,031$).

Não houve associação significativa entre a evolução clínica e avaliação de margem cirúrgica, tamanho da lesão e acometimento de linfonodo ($p=1.000$; $p=1.000$; $p=0,240$, respectivamente).

Observou-se correlação com o aumento do percentual de células marcadas com 5 metilcitosina no CCE em cães idosos ($p=0,008$) e diminuição da porcentagem de células marcadas com 5 metilcitosina associada a presença de crostas na lesão de carcinoma de células escamosas ($p=0,044$).

A expressão de um anticorpo na ceratose actínica e no carcinoma de células escamosas não influenciou a expressão dos demais anticorpos nas duas lesões.

A diminuição na expressão de pancitoqueratina AE1/AE3 apresentou uma associação com a invasão linfática em carcinoma de células escamosas com valor de $p=0,033$.

6 DISCUSSÃO

A ceratose actínica é uma lesão pré-neoplásica comumente associada à exposição solar excessiva, podendo evoluir para o carcinoma de células escamosas. Em nosso estudo, a raça mais acometida foi a American PitBull Terrier, condizendo com a literatura (North; Banks, 2009; Costa, 2009; Vail; Withrow, 2007; Poggiani et al., 2012). As regiões anatômicas mais acometidas pela doença são locais com menor cobertura de pelos, como face interna de membros, plano nasal, pina de orelhas e abdome como descrito em nosso estudo (Almeida et al., 2001, Carvalho, 2008; Milanta et al., 2016).

Os cães de meia idade foram os mais acometidos pelo carcinoma de células escamosas e pela ceratose actínica, semelhante ao que é descrito em literatura. Apesar da literatura não descrever predileção sexual, em nossos casos constatamos maior incidência de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas em cães machos, (Vail; Withrow, 2007; Gross et al. 2005; Larsson; Lucas, 2016). Estes achados foram contrários aos achados de Costa (2009) em que as lesões foram diagnosticadas em cães mais jovens e, em sua maioria, fêmeas.

As lesões de ceratose actínica foram caracterizadas pela presença de placas eritematosas, pápulas e máculas condizentes com o que foi descrito por alguns autores (Carpenter et al., 2004; Stockfleth; Kerl, 2006; Berman et al., 2006). Já, o padrão da lesão do carcinoma de células escamosas é descrito como lesões crostosas, ulcerativas, eritematosas, disseminadas ou localizadas (Costa, 2009; North; Banks, 2009) como observado em nosso trabalho.

As lesões diagnosticadas como ceratose actínica exibiram achados histopatológicos na epiderme caracterizados por hiperplasia, paraceratose, ortoceratose, manutenção da polaridade dos ceratinócitos e pleomorfismo celular moderado, observou-se na coloração PAS integridade da membrana basal, como descrito por Stockfleth e Kerl (2006), Fravot et al. (2009) e Hargis et al. (1977).

Segundo Huber et al. (2007), Robins e Cotran (2010), Papadogiannakis et al. (2008) e Favrot et al. (2009) visualiza-se na avaliação histopatológica do carcinoma de células escamosas, hiperplasia da epiderme, paraceratose, ortoceratose, perda de maturação ordenada com presença de ceratinócitos atípicos em toda espessura total da epiderme. Aumento do número de mitoses atípicas. Pleomorfismo celular. Em nosso estudo observou-se hiperplasia, hiperkeratose, paraceratose, acantose e abundante proliferação de ceratinócitos neoplásicos invadindo a derme. Presença de pérolas córneas. As células exibiam moderado a intenso pleomorfismo celular. A relação núcleo/citoplasma estava aumentada, achados semelhantes aos descritos pelos autores citados.

Alterações na metilação global do DNA têm sido descrita como um fator importante para o desenvolvimento de neoplasias (Laird; Jaenisch, 1996; Vaid et al., 2012; Chowdhury et al., 2017). Neste trabalho foi observado maior porcentagem do números de células marcadas para 5mc em carcinoma de células escamosas comparado a ceratose actínica, semelhante ao que foi descrito por Vaid et al. (2012) que observou hipermetilação em células de CCE, em humanos. Constatou-se um aumento na porcentagem de células marcadas com 5mc em cães idosos, Liang et al. (2015), não observou correlação de hipermetilação com idade, em humanos, porém Lahtz et al. sugeriu que o aumento na metilação global no DNA pode estar associado a exposição solar crônica, no desenvolvimento de tumores cutâneos, o que pode explicar este achado.

Constatou-se a diminuição na percentagem de células expressando 5mc quando há presença de crostas nas lesões de CCE, não há informações disponíveis em literatura com resultados semelhantes e estes encontrados.

Em nosso trabalho não foi observada associação entre a expressão de p53 em ceratose actínica e carcinoma de células escamosas, como foi descrito também por Florence et al. (2015) em CA e CCE, em humanos. Stelkovics et al. (2013) observaram um aumento na expressão de p53 em CCE humano porém não houve diferença na expressão de p53 em graus histológicos diferentes, como descrito neste trabalho.

Alguns estudos observaram a imunomarcação de p53 citoplasmática e sua associação a um fator prognóstico desfavorável, em nosso trabalho foi observada marcação citoplasmática de p53, porém sem associação com evolução clínica do paciente (Jansson et al., 2001; Green; Kroemer, 2009; O'Brate; Giannakakou, 2003; Gamblin et al., 1997).

A avaliação imuno-histoquímica do Ki-67 tem sido amplamente utilizada para avaliar o índice de proliferação celular em diferentes neoplasias em cães. Em nosso trabalho, observamos um aumento no índice de proliferação celular no carcinoma de células escamosas comparado a ceratose actínica, como descrito Stelkovics et al. (2012) e Lan et al. (2014).

Em 1999, Koseki et al. afirmaram que houve uma diminuição na expressão de E-caderina em carcinoma de células escamosas comparada a pele normal em humanos, e quando havia acometimento linfático a expressão era fraca ou ausente, em nosso trabalho, não foi observado diferença significativa na expressão de E-caderina com ceratose actínica, carcinoma de células escamosas e seus diferentes graus histológicos e metástase em linfonodo, porém constatou-se uma marcação heterogênea da E-caderina na membrana plasmática de CCE, compara a CA, como descrito por PEREIRA et al.

(2016) em carcinoma de células escamosas oral comparada a mucosa oral normal, esta heterogeneidade é descrita como uma perda da funcional da proteína que está associada a invasão e progressão tumoral (Berx; Roy, 2009; Graff et al., 2000).

Yaşin et al. (2012) não observaram diferença na expressão de COX-2 em CCE e CA em humanos e em sua diferenciação histológica, achados semelhantes aos descrito em nosso trabalho.

Observou-se uma associação entre invasão linfática e diminuição da expressão de pancitoqueratina AE1/AE3, nenhum achado como este é descrito em literatura em carcinoma de células escamosas cutâneo, porém pode sugerir perda do perfil epitelial que favorece a invasão neoplásica, no entanto, não foi observado expressão de Vimentina em células epiteliais para caracterizar melhor esta transição.

Por meio deste estudo, não foi possível identificar fatores etiológicos para CA e CCE na pele de cães; entretanto, em virtude do fato das mesmas localizarem-se em regiões destituídas de pelagem exuberante, sugere-se que a radiação solar direta ou refletida a partir de pisos claros poderia estar envolvida.

O fato destas lesões coexistirem na pele dos cães sugere que há uma evolução contínua das mesmas, e o clínico/cirurgião tem de tratar as lesões neoplásicas ao mesmo tempo e terá de instituir novos protocolos para prevenir a evolução da CA para CCE.

Finalmente, o estudo permitiu conhecer melhor algumas das alterações morfológicas e moleculares encontradas em CA e CCE, e estudos futuros permitirão melhores formas de tratar e prevenir tais lesões.

7 CONCLUSÃO

- Cães machos da raça American PitBull Terrier de pelagem branca são frequentemente acometidos pela ceratose actínica e carcinoma de células escamosas. Estudos epidemiológicos precisam ser feitos para verificar a existência de maior suscetibilidade a estas doenças cutâneas nesta raça.
- Ceratose Actínica e Carcinoma de Células Escamosas coexistiram na pele dos pacientes estudados; houve presença de ulceração, crostas e neoplasias maiores que 6 cm foram os mais observados neste estudo.
- Houve diferença significativa no índice de proliferação celular em CCE comparado a CA, concluindo-se que o aumento da proliferação celular está associada com a transformação maligna.
- Foi possível concluir que não houve associação significativa na expressão de COX-2 e p53 em ceratose actínica e carcinoma de células escamosas.
- Conclui-se que há heterogeneidade na expressão da Ecaderina em CCE, que pode estar associada a uma perda da função desta proteína, tornando-se um outro método de classificação da expressão de Ecaderina, por meio de imuno-histoquímica.
- O aumento da porcentagem de células marcadas com 5 metilcitosina em CCE comparado a CA, sugere uma hipermetilação global do DNA que pode gerar supressão em proto-oncogenes.
- O aumento na expressão de 5 metilcitosina em cães de idade mais avançadas sugere que a metilação global do DNA é detectada após um maior tempo de exposição ao fator etiológico.

- A diminuição da expressão de pancitoqueratina AE1/AE3 em tumores que apresentam invasão linfática propõe a perda da característica epitelial da neoplasia, favorecendo a sua progressão e invasão. Porém não foi observado expressão de vimentina nas células epiteliais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acatürk TO, Edington H. Nonmelanoma Skin Cancer. *Clinics in Plastic Surgery*. 2005; 32: 237-248.

Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2001; 344: 975-983.

Albaric O, Bret L, Amardeihl, Delverdier. Immunohistochemical expression of p53 in animal tumors: a methodological study using four anti-human p53 antibodies. *Histol. Histopathol*. 2001; 16: 113-121.

Almeida EMP, Piché C, Sirois J, Doré M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001; 49: 867-875.

Almeida Jr, HL. Citoqueratinas. *An. Bras. Dermatol*. 2004; 79:135-145.

Al-Sader MH, Doyle E, Kay EW, Bennett M, Walsh CB, Curran B, Milburn C, Leader M. Proliferation indexes - a comparison between cutaneous basal and squamous cell carcinomas. *J. Clin. Pathol*. 1996; 49: 549-551.

Anwar J, Wrone DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The Development of Actinic Keratosis into Invasive Squamous Cell Carcinoma: Evidence and Evolving Classification Schemes. *Clinics in Dermatology*. 2004; 22: 189-196.

Athanassiadou AM; Lazaris AC; Patsouris E, Tsipis A Chelidonis G; Aroni K. Significance of Cyclooxygenase 2, EZH2 Polycomb Group and p53 Expression in Actinic Keratosis and Squamous Cell Carcinomas of the Skin. *American Journal of Dermatopathology*. 2013; 35:425-431.

Bardagí M, Fondevila D, Ferrer, L. Immunohistochemical detection of COX-2 in feline and canine actinic keratoses and cutaneous squamous cell carcinoma. *J. Comp. Path.* 2012; 146: 11-17.

Berman B, Bienstock L, Kuritzky L, Mayeaux EJ, Tying SK. Actinic keratoses: sequelae and treatments. *The Journal of Family Practice.* 2006; 55: 1-8.

Berx G, Roy F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 2009; 1: 1-27.

Blazquez FJH. Embriologia e histologia do tegumento. In: Larsson CE, Lucas R. *Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária.* 1 ed. São Caetano do Sul: Interbook; 2016

Bogliolo Filho, G. *Patologia geral.* 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

Brash ED, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 1991; 88:10124-10128.

Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin.* 2015; 8: 1-9.

Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast G, Masferrer J, Pentland AP. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 723–729.

Butani A, Arbesfeld DM, Schwartz RA. Premalignant and Early Squamous Cell Carcinoma. *Clinics in Plastic Surgery.* 2005; 32: 223-235.

Caldwell CJ, Hobbs C, McKee PH. The relationship of Ki-67 and involucrin expression in proliferative, pre-neoplastic and neoplastic skin. *Clinical and Experimental Dermatology.* 1997; 22:11-16.

Carpenter PM, Linden KG, McLaren CE, Li KT, Arain S, Barr RJ, Hite P, Sun JD, Meyskens Jr FL. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. Orange. 2004; 13: 1996-2002.

Carvalho LG. Dermatite actínica em canino (canis familiaris): relato de caso. 2008. Dissertação (Especialização Lato Sensu em Clínica Médica e Cirúrgica em pequenos animais) - UCB-QUALITTAS. Rio de Janeiro; 2008.

Chang PL, Hsieh YH, Wang CC, Juliana MM, Tsuruta Y, Timares L, Elmets C, Ho KJ. Osteopontin facilitates ultraviolet B-induced squamous cell carcinoma development. *Journal of Dermatological Science*. 2014; 75: 121-132.

Chowdhury B, Cho IH, Irudayaraj J. Technical advances in global DNA methylation analysis in human cancers. *J Biol Eng*. 2017; 11: 1-12.

Ciortea CD, Jung I, Gurzu S, Kövecsi A, Turdean SG, Bara T. Correlation of angiogenesis with other immunohistochemical markers in cutaneous basal and squamous cell carcinoma. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 2015; 56: 665-670.

Cockerell CJ. Pathology and Pathobiology of the actinic (solar) keratosis. *British Journal of Dermatology*. 2003; 149: 34-36.

Costa SS. Proliferação celular e expressão da cicloxigenase-2 como parâmetros prognósticos na ceratose actínica e no carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. 2009. Dissertação (mestrado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal; 2008.

Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell*. 2000; 103: 481-490.

Elisson TI, Smith MK, Gilliam AC, MacDonald PM. Inactivation of the Vitamin D Receptor Enhances Susceptibility of Murine Skin to UV-induced Tumorigenesis. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008; 28: 2508-2517.

Elmets CA, Ledet JJ, Athar, M. Cyclooxygenases: mediators of UV-induced skin cancer and potential targets for prevention. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014; 134: 2497-2502.

Ferreira FC, Soares MJ, Carvalho S, Borralho L, Vicente G, Branco S, Correia J, Peleteiro MC. Four cases of cell cannibalism in highly malignant feline and canine tumors. *Diagnostic Pathology*. 2015; 10: 2-6.

Fischer SM, Pavone A, Mikulec C, Langenbach R, Rundhaug JE. Cyclooxygenase-2 Expression Is Critical for Chronic UV-Induced Murine Skin Carcinogenesis. *Mol. Carcinog*. 2007; 46: 363–371.

Florence MEB, Massuda JY, Soares TCB, Stelini RF, Poppe LM, Bröcker E, Metze K, Cintra ML, Souza EM. p53 immunoexpression in stepwise progression of cutaneous squamous cell carcinoma and correlation with angiogenesis and cellular proliferation. *Pathology – Research and Practice*. 2015; 211: 782-788.

Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann. Clin. Lab. Sci*. 2000; 30: 3-21.

Fravot C, Welle M, Heiman M, Godson DL, Guscelli F. Clinical, Histologic and immunohistochemical analyses of Feline Squamous Cell Carcinoma in Situ. *Veterinary Pathology*. 2006; 46:25-33.

Gamblin RM, Sagartz JE, Couto CG. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *AJVR*. 1997; 58: 857-863.

Giordano CN, Yew YW, Spivak G, Lim HW. Understanding photodermatoses associated with defective DNA repair: Syndromes with cancer predisposition. *J. Am. Acad. Dermatol*. 2016; 75: 855-870.

Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation Patterns of the E-cadherin 5' CpG Island Are Unstable and Reflect the Dynamic, Heterogeneous Loss of E-cadherin Expression during Metastatic Progression. *The journal of biological chemistry*. 2000; 275: 2727-2732.

Green DR, Kroemer, G. Cytoplasmic functions of the tumor suppressor p53. *Nature*. 2009; 458: 1-10.

Gross TL, Irhke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2 ed. Oxford: Blackwell Science Ltd; 2005.

Hargis AM, Thomassen RW, Phemister RD. Chronic dermatosis and cutaneous squamous cell carcinoma in the beagle dog. *Vet. Pathol*. 1977; 14: 218-228.

Hargis AM, Thomassen NRW. Solar Keratosis (Solar Dermatitis, Senil Keratosis) and Solar Keratosis With Squamous Cell Carcinoma. *American Journal of Pathology*. 1979; 94: 193-196.

Hernandez-Blazquez FJ, Habib N, Dumollard JM, Barthelemy C, Benchaib M, Capoa A, Niveleau A. Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. *Journal of the British Society of Gastroenterology*. 2000; 47: 689-693.

Huber JR, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl h, Sterry W, Stockfleth E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *British Journal of Dermatology*. 2007; 156: 8-12.

Jansson A, Gentile M, Sun XF. P53 mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic P53 accumulation. *Int. J. Cancer*. 2001; 92: 338-341.

Jiang Y, Liao L, Shrestha C, Ji S, Chen Y, Peng J, Wang L, Liao E, Xie Z. Reduced expression of E-cadherin and p120-catenin and elevated expression of PLC- γ 1 and PIKE are associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. *Int J. Clin. Exp. Pathol.* 2015; 8: 9042-51.

Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, Leffell D J, Tarone RE, Brash DE. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996; 93: 14025-14029.

Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia veterinária*. 5 ed. São Paulo: Manole; 2000.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009; 119:1420-8.

Känel T, Huber A. DNA methylation analysis. *The European journal of medical sciences.* 2013; 143: 1-16.

Keller SM, Schade B, Rickenbacher AB, Brugnera E, Wergin MC, Müller EJ, Suter MM, Guscetti FA. Comprehensive Test System to Identify Suitable Antibodies Against p 53 Immunochemical Analysis of Canine Tissues. *Journal of Comparative Pathology.* 2007; 137: 59-70.

Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Experimental Dermatology.* 2003; 12:109-125.

Kimura KC, Gárate AP, Dagli MLZ. Retrospective study of neoplasms in domestic animals: a survey between 1993 and 2002 of the Service of Animal Pathology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Southeast Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 2012; 5: 60-69.

Koseki S, Aoki T, Ansai S, Hozumi Y, Mitsuhashi Y, Kondo S. An immunohistochemical study of E-Cadherin expression in human squamous cell carcinoma of the skin: relationship between decreased expression of E-cadherin in the primary lesion and regional lymph node metastasis. *The Journal of Dermatology*. 1999; 26: 416-422.

Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annual Review of Genetics*. 1996; 30:441-464.

Lahtz C, Kim SI, Bates SE, Li AX, Wu X, Pfeifer GP. UVB irradiation does not directly induce detectable changes of DNA methylation in human keratinocytes. *F1000Res*. 2013; 2: 1-10.

Lan YJ, Chen H, Chen JQ, Lei QH, Zheng M, Shao ZR. Immunolocalization of vimentin, keratin 17, Ki-67, Involucrin, β -Catenin and E-cadherin in Cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol. Oncol. Res*. 2014; 20: 263-266.

Larsson CE, Lucas R. *Tratado de Medicina Externa: Dermatologia Veterinária*. 1 ed. São Caetano do Sul: Interbook; 2016

Lebwohl M. Actinic keratosis: epidemiology an progression to squamous cell carcinoma. *British Journal of Dermatology*. 2003; 149: 21-33.

Lee JH, Piao MS, Choi JY, Yun SJ, Lee JB, Lee SC. Up-regulation of cyclooxygenase 2 and matrix metalloproteinases-2 and -9 in cutaneous squamous cell carcinoma: active role of inflammation and tissue remodeling in carcinogenesis. *Ann Dermatol*. 2013; 25: 145-151.

Li G, Ho VC, Berean K, Tron VA. Ultraviolet radiation induction of squamous cell carcinomas in p53 transgenic mice. *Cancer Res*. 1995; 55:2070–2074.

Li G, Tron V, Ho V. Induction of squamous cell carcinoma in p53-deficient mice after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol*. 1998 Jan;110:72-5.

Liang J, Kang X, Halifu Y, Zeng X, Jin T, Zhang M, Luo D, Ding Y, Zhou Y, Yakeya B, Abudu D, Pu X. Secreted frizzled-related protein promoters are hypermethylated in cutaneous squamous carcinoma compared with normal epidermis. *BMC Cancer*. 2015; 15: 1-7.

Liu K, Yu d, Cho Y-Y, Bode, Am, Ma W, Yao K, Li S, Li J, Bowden GT, Dong Z, Dong Z. Sunlight UV-induced skin cancer relies upon activation of the p38 α signaling pathway. *Cancer Research*. 2013; 73:2181-2188.

Margaritescu C, Florescu M, Raica M, Simionescu C, Mogoanta L, Preda E. The immunohistochemical profile of luminal epithelial neoplastic component from pleomorphic adenomas of salivary glands. *Rom. J. Morphol. Embryol*. 1999-2004; 45: 97-118.

Milanta F, Andreani G, Rocchigiani G, Lorenzi D, Poli A. Correlation between cyclooxygenases-2 and vascular endothelial growth factor expression in canine and feline squamous cell carcinoma. *J. Comp. Path.* 2016; 154: 297-303.

Miller Jr WH, Griffin CE, Campbell KL. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 7. ed. St. Louis: Saunders; 2013. cap. 1. p. 1-56.

Mohtasham N, Babakoochi S, Shiva A, Shadman A, Kamyab-Hesari K, Shakeri MT, Sistani NS. Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. *Pathology - research and practice*. 2013; 209: 110-114.

Monteiro EO. Filtros solares e fotoproteção. *RBM Especial Dermatologia e Cosmiatria*. 2010; 67: 5-18.

Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Lasalle EM, Thomas P, Piette F, Formstecher P, Polakowska R, Danzé PM. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16^{INK4a} tumor suppressor. *Cancer Letters*. 2002;176:205-214.

Mulas JM, Millan Y, Villamor ER, Bautista MJ, Rollon E, Monteros AE. Apoptosis and mitosis in tumours of the skin an subcutaneous tissues of the dog. *Research in Veterinary Science*. 1999; 66: 139-146.

Muller GH, Kirk RW, Scott DW. *Dermatologia dos pequenos animais*. 3. ed. São Paulo: Manole Ltda.; 1985.

Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, Uchida K, Yamaguchi R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and p53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J. Vet. Med. Sci*. 2000; 62: 743-750.

Nandakumar V, Vaid M, Tollefsbol TO, Katiyar SK. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis*. 2011; 32: 597-604.

Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, Salasche SJ, Bangert JL, Grogan TM, Bozzo PO. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett*. 1994; 85: 23-9.

Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1778: 562-571.

North S, Banks T. *Introduction to small animal oncology*. 1 ed. Londres: Saunders Elsevier; 2009.

O'Brate A, Giannakakou P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code?. *Drug Resistance update*. 2003; 6: 313-322.

Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *British journal dermatology*. 2002;146: 20-23.

Papadogiannakis E, Kontos V, Frangia KA. Case of canine squamous cell carcinoma secondary to solar keratosis (actinic carcinoma in situ). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2008; 59:64-70.

Pelster MW, Amin SM, Yoo S. Multiple recurrent squamous cell carcinomas and utility of anticytokeratin immunohistochemistry. *JAAD Case Rep*. 2016; 2: 346–349.

Pereira CH, Morais MO, Martins AFL, Soares MQS, Alencar RCG, Batista AC, Leles CR, Mendonça EF. Expression of adhesion proteins (E-cadherin and β -catenin) and cell proliferation (Ki-67) at the invasive tumor front in conventional oral squamous cell and basaloid squamous cell carcinomas. *Archives of Oral Biology*. 2016; 61: 8-15.

Poggiani SSC, Hatayde, MR, Laufer-Amorim R, Werner J. Expression of ciclooxigenases-2 an Ki-67 in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine*. 2012; 2: 41-47.

Pradhan S, Kim HK, Thrash CJ, Cox MA, Mantena SK, Wu J-H, Athar M, Katiyar SK, Elmetts CA, Timares L. A critical role for the proapoptotic protein Bid in UV-induced immune suppression and cutaneous apoptosis. *Journal of Immunology*. 2008; 181: 3077-3088.

Prasad R, Katiyar SK. Prostaglandin E₂ promotes UV radiation-Induced immune suppression through DNA hypermethylation. *Neoplasia*. 2013; 15: 795-804.

Robbins SL, Cotran RS. *Pathologic Basis of disease*. 8 ed. Philadelphia: Saunders; 2010.

Rigel DS, Rigel EG, Rigel, A. C. Effects of altitude and latitude on ambient UVB radiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999; 40: 114-116.

Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, Sterry W, Stockfleth E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. *British Journal of Dermatology*. 2007; 156: 8-12.

Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. *Patologia: Bases Clínicopatológicas em medicina*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Rundhaug, JE, Fischer SM. Cyclo-oxygenase-2 Plays a Critical Role in UV-induced Skin Carcinogenesis. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84:322-329.

Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda.; 2001.

Schuch AP, Silva Galhardo RS, Lima-Bessa KM, Schuch NJ, Menck CF. Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2009; 8: 111-20.

Schwartz RA. Premalignant keratinocytic neoplasms. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1996; 35: 223-242.

Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. 6. ed. Philadelphia: Saunders; 2001. cap. 1. p. 1-70.

Shujiao L, Lilin H, Yong S. Cyclooxygenase-2 expression and association with skin cancer: A meta-analysis based on Chinese patients. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2017; 12: 288-290.

Silva TA, Coelho G, Bocca AL, Cavalcante Neto FF. Expression of apoptotic, cell proliferation regulatory, and structural proteins in actinic keratosis and their association with dermal elastosis. *J. Cutan. Pathol*. 2007; 34: 315-323.

Sivrikoz ON, Uyar B, Dag F, Tasl F, Sanal SM. CXCR-4 and COX-2 expression in basal cell carcinomas and well-differentiated squamous cell carcinomas of the skin; their relationship with tumor invasiveness and histological subtype. *Turk Patoloji Derg*. 2015; 3: 30-5.

Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell Biol.* 2010; 1-21.

Sridevi U, Jain A, Nagalaxmi V, Kumar UV, Goyal S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinomas. *European Journal of Dentistry.* 2015; 9: 364-372.

Stelkovics E, Kiszner G, Meggyeshazi N, Korom I, Varga E, Nemeth I, Molnar J, Marczinovits I, Krenacs T. Selective in situ protein expression profiles correlate with distinct phenotypes of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Histol. Histopathol.* 2013; 28: 941-54.

Stockfleth E, Kerl H. Guidelines for the management of actinic keratoses. *European Journal of Dermatology.* 2006; 16:599-606.

Suter MM, Schulze K, Bergman W, Wellw M, Roosje P, Muller EJ. In: Eeboer DJ, Affolter VK, Hill PB. *Advances in Veterinary Dermatology.* Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.

Svobodova A, Walterova D, Vostalova J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006; 150: 25-38.

Teifke JP, Lörh CV. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. *J. Comp. Path.* 1996; 114: 205-210.

Vaid M, Prasad R, Singh T, Jones V, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins reactive silenced tumor suppressor genes in human skin cancer cells by targeting epigenetic regulators. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2012; 236: 122-130.

Verneuil L, Leboeuf C, Bousquet G, Brugiére C, Elbouchtaoui M, Plassa LF, Peraldi MN, Lebbé C, Ratajczak P, Janin A. Donor-derived stem-cells and epithelial mesenchymal transition in squamous cell carcinoma in transplant recipients. *Oncotarget*. 2015; 6: 41497-507.

Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8: 275-283.

Watanabe S, Watanabe R, Oton-Leite AF, Alencar Rde C, Oliveira JC, Leles CR, Batista AC, Mendonça EF. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Sci*. 2010; 52: 417-24.

Withrow SJ, Vail DM. *Small animal clinical oncology*. 4 ed. St. Louis: Saunders; 2007.

Wu J, Zhang JR, Qin J. Clinical significance of methylation of E-cadherin and p14ARF gene promoters in skin squamous cell carcinoma tissues. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014; 7: 1808-1812.

Yalçın KU, Seçkin S. The expression of p53 and COX-2 in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and actinic keratosis cases. *Turk. Patoloji. Derg.* 2012; 28:119-27.

Zhan H, Zheng H. The role of topical cyclo-oxygenase-2 inhibitors in skin cancer: treatment and prevention. *Am. J. Clin. Dermatol.* 2007; 8: 195-200.