

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VITÓRIA SOUZA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**Expressão dos imunomarcadores de E-caderina e Caspase-3 em
carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com
características clínicas e epidemiológicas**

São Paulo
2023

VITÓRIA SOUZA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Expressão dos imunomarcadores de E-caderina e Caspase-3 em carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com características clínicas e epidemiológicas

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Claudia Momo

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Nascimento, Vitória Souza de Oliveira
Expressão dos imunomarcadores de E-caderina e Caspase-3 em
carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com
características clínicas e epidemiológicas / Vitória Souza de Oliveira
Nascimento ; orientador Cláudia Momo - versão corrigida.-- São
Paulo, 2023.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada - Departamento de Patologia) - Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
Paulo, 2023.

1. Apoptose. 2. Adesão celular . 3. Neoplasia. 4. Pênis. I.
Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 19th May 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Expression of e-cadherin and caspase-3 in equine penile squamous cell carcinoma and their correlation with clinical and epidemiological features*", protocol number CEUAX 5752230721 (ID 001910), under the responsibility Claudia Momo, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day September 16, 2021.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Expressão dos imunomarcadores de e-caderina e caspase-3 em carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com características clínicas e epidemiológicas*", protocolado sob o CEUAX nº 5752230721, sob a responsabilidade de Claudia Momo, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 16 de setembro de 2021.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUZA DE OLIVEIRA NASCIMENTO, Vitória

Título: **Expressão dos imunomarcadores de E-caderina e Caspase-3 em carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com características clínicas e epidemiológicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho à Deus, meu amor maior, minha força e esperança em todos os momentos. À minha mãe, meu irmão, Nina, Gui, Mel, Cristal, Manu, Luna e Chiara.

Tudo por vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo amor incondicional, por ser minha fortaleza em todos os momentos, pela vida, por colocar sonhos no meu coração e por estar sempre comigo na realização de cada um. Nem todas as palavras do mundo conseguiriam expressar o tamanho do meu amor e da minha gratidão. Obrigada por tanto!

Gratidão a minha mãe Fânia, por tantas renúncias pela minha vida, por tantas batalhas para realizar meus sonhos, por sempre me dizer que eu posso tudo que eu quiser e me forçar a sair da zona de conforto mesmo quando o medo quis me dominar. Obrigada por tudo que você é, obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma. Minhas conquistas não são minhas, mas suas... fruto de tudo que você plantou. Você é maravilhosa, a melhor mãe do mundo!

Meu irmão Vinícius, parte tão importante do meu coração e da minha vida, que me inspira a superar, acreditar em mim e nunca desistir. Um exemplo de esforço, disciplina e determinação. Você nem imagina o quanto contribuiu para eu ser quem sou, tudo isso também é mérito seu!

Aos meus filhotes do coração Nina, Gui, Mel, Cristal, Manu, Luna, Chiara e Ariel, por serem seres tão especiais, pelo amor incondicional, por serem o meu ponto de paz, alegrias e aprendizados. Sem vocês nada disso estaria acontecendo. Foi esse amor tão puro que me despertou. Vocês têm meu amor e gratidão eternos.

Ao meu pai José, e aos meus avós José Bento e Maria de Lourdes, pelo esforço em toda a vida para que eu pudesse estar aqui hoje. Obrigada!

Ao meu grande amigo Gilmar, por todo apoio, companheirismo, por estar ao meu lado vencendo muitas batalhas durante esses anos de amizade. Sua amizade é benção, é presente Deus na vida, já te disse isso e não me canso de repetir.

À minha orientadora, Claudia Momo, por ser essa pessoa tão ímpar. Como a vida nos surpreende... como Deus faz tudo de forma perfeita... isso é um bom resumo do que sinto quando penso no presente que Ele me deu me dando a senhora como orientadora. Tão especial, cuidadosa, empática, que pensa no ser humano que somos antes de qualquer coisa. Desde a residência você me deu forças e nem sabe disso rs. Que esse seja apenas o início da nossa jornada juntas. Muito obrigada por tudo.

Aos professores, que Deus me deu de presente como amigos para a vida, Erico Lima e Carla Braga. Obrigada por tudo que me ensinaram, obrigada pela amizade e pela troca tão rica que isso nos proporciona. Vocês inspiram, nunca duvidem disso.

Não posso deixar de mencionar Marcello Tedardi, grande pessoa, inspiração e incentivador do meu desenvolvimento, que mesmo antes de me conhecer demonstrou tanta humildade, empatia, paciência. Obrigada por acreditar no meu potencial, me ensinar tanto, dividir tantas experiências e tornar meu caminho mais leve. Sem seu apoio esse projeto não seria possível.

Sem contar Luiza, Rodrigo, Murilo, Maria Isabela que tanto me ensinaram e ensinam, que muitas vezes acreditaram em mim quando eu não acreditei, por me proporcionarem momentos tão bons de aprendizado e amizade. Mesmo sem saber, vocês foram muito importantes para que eu conseguisse realizar esse projeto. Vocês são demais.

Obrigada aos residentes e colaboradores do VPT que me acompanharam em todo esse projeto, em especial Natasha e Ana Flávia. Obrigada pela paciência e por me ajudarem sempre que precisei.

Não posso deixar de agradecer aos animais que participaram desse estudo. Vocês estão sendo agentes de descoberta, transformação e avanços na saúde animal, e quem sabe na humana também. Obrigada!

*“Mas os que esperam no Senhor renovam suas forças, criam asas como as águias,
correm sem se cansar, caminham sem parar.”*

Isaías 40:31

RESUMO

NASCIMENTO, V.S.O. **Expressão dos imunomarcadores de E-caderina e Caspase-3 em carcinoma espinocelular peniano em equinos e sua correlação com características clínicas e epidemiológicas.** 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

As neoplasias são uma importante causa de morbidade e mortalidade em equinos, sendo o carcinoma espinocelular (CEC), também chamado de carcinoma de células escamosas, o tumor maligno genital mais comum na espécie e a neoplasia mais frequente em equídeos no Estado de São Paulo. As neoplasias frequentemente infiltram o corpo cavernoso e podem provocar metástases em linfonodos regionais, tendo, geralmente, prognóstico reservado a ruim, devido à invasão local e recidiva. Diante da importância da doença, objetiva-se verificar se há diferença no padrão de expressão de imunomarcadores de apoptose e adesão celular, de acordo com o grau de diferenciação celular das neoplasias. Vinte amostras de CEC peniano de equinos provenientes do Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo foram analisadas histologicamente e classificadas de acordo com seu grau de diferenciação. Além disso, também foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica, com os imunomarcadores Caspase-3 e E-caderina. Os dados clínicos dos animais foram coletados e analisados utilizando correlação de Kendall e o teste de Mann-Whitney. Verificou-se que há correlação positiva entre a expressão dos imunomarcadores e que não há correlação entre idade e grau de diferenciação da neoplasia, assim como não se encontrou diferença estatisticamente significativa na expressão dos imunomarcadores de acordo com o grau de diferenciação.

Palavras-chave: Apoptose. Adesão celular. Neoplasia. Pênis.

ABSTRACT

NASCIMENTO, V.S.O. **Expression of E-cadherin and Caspase-3 immunomarkers in penile squamous cell carcinoma in horses and their correlation with clinical and epidemiological characteristics.** 2023. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Neoplasms are an important cause of morbidity and mortality in horses, and squamous cell carcinoma (SCC), also called squamous cell carcinoma, is the most common malignant genital tumor in the species and the most frequent neoplasm in horses in the State of São Paulo. Neoplasms often infiltrate the corpora cavernosa and can cause metastases in regional lymph nodes, generally having a poor to poor prognosis, due to local invasion and recurrence. Given the importance of the disease, the objective is to verify whether there is a difference in the expression pattern of immunomarkers of apoptosis and cell adhesion, according to the degree of cell differentiation of the neoplasms. Twenty samples of equine penile SCC from the Animal Pathology Service of the Veterinary Hospital of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo were analyzed histologically and classified according to their degree of differentiation. In addition, they were also submitted to the immunohistochemical technique, with the immunomarkers Caspase-3 and E-cadherin. The animals' clinical data were collected and analyzed using Kendall's correlation and the Mann-Whitney test. It was found that there is a positive correlation between the expression of immunomarkers and that there is no correlation between age and the degree of differentiation of the neoplasia, as well as no statistically significant difference was found in the expression of immunomarkers according to the degree of differentiation.

Keywords: Apoptosis. Cell adhesion. Neoplasia. Penis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do carcinoma espinocelular sugerida pela Organização Mundial da Saúde (OMS).....	17
Tabela 2 - Anticorpos primários, anticorpos secundários, marcação celular e forma de recuperação antigênica utilizados na reação imuno-histoquímica de carcinomas espinocelulares penianos em equinos.....	25
Tabela 3 - Características clínicas dos equinos com CEC peniano que foram avaliados pelo Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP.....	28
Tabela 4 - Características histopatológicas das neoplasias que foram avaliadas pelo Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP.....	29

LISTA ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Boxplot baseado na idade dos equinos que apresentaram CEC peniano e foram avaliados pelo Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da FMVZ/USP.....	26
Gráfico 2 - Raça dos equinos com carcinoma espinocelular peniano atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.....	27
Gráfico 3 - Gráfico de dispersão com os valores médios de células que foram expressas.....	31
Figura 1 - Matriz de correlação da expressão de E-caderina e Caspase-3.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	CARCINOMA ESPINOCELULAR PENIANO EM EQUINOS	16
2.2	APOPTOSE	18
2.3	ADESÃO CELULAR	19
2.4	CASPASE-3	20
2.5	E-CADERINA	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	CHARACTERIZAÇÃO DA NEOPLASIA	23
3.2	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	24
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICES	45

A apoptose é um importante processo envolvido na patogênese e na progressão de neoplasias. No entanto, ainda não foi extensivamente investigada em carcinoma espinocelular peniano em equinos (SINGH et al, 2022).

Além disso, há também o importante papel das caderinas. Elas pertencem a uma classe de moléculas de adesão celular, expressas na superfície das células de todas as camadas epidérmicas. A E-caderina é a principal caderina envolvida na adesão celular epitelial e nas sinalizações intracelulares que participam da mediação da proliferação e motilidade celular (FERNANDES, 2016).

No processo de formação de carcinomas, ocorre a desestabilização da junção aderente epitelial, tendo como característica a expressão diminuída da E-caderina. A redução de sua expressão está relacionada com a progressão de alguns tipos de neoplasias, com seu potencial metastático e com o prognóstico, principalmente nos carcinomas. Uma hipótese é que isso se relaciona com as vias de sinalização que induzem a transição epitélio-mesenquimal, a qual contribui para o comportamento invasivo dos processos malignos (RODRIGUES, 2009; SOUZA, 2009).

De acordo com os resultados obtidos por João et al (2011), a expressão reduzida da E-caderina pode indicar maior poder infiltrativo e, conseqüentemente, um prognóstico ruim, corroborando com evidências encontradas em outros tipos de neoplasias malignas em humanos (HUANG et al, 2017).

Tendo em vista que a ocorrência de perda ou ganho de moléculas de adesão e a diminuição da apoptose são importantes para a disseminação tumoral, além do aumento cada vez maior da ocorrência de neoplasias em equinos, faz-se cada vez mais necessário conhecer os biomarcadores específicos e utilizá-los para monitorar a progressão da neoplasia (GOSENS et al, 2015; BRYNE, 1998).

Em humanos, os carcinomas penianos, dos quais 95% são carcinomas de células escamosas, são um problema de saúde relativamente comum, particularmente em países em desenvolvimento. Esses estudos, na era da abordagem '*One Health*', podem sugerir o CEC em equinos como um modelo pré-clínico válido para doenças humanas (PORCELLATO et al., 2020).

Diante disso, objetiva-se verificar se há diferença no padrão de expressão de imunomarcadores de apoptose e adesão celular de acordo com o grau de diferenciação celular das neoplasias, possíveis correlações entre eles e também com características clínicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular peniano em equinos

O carcinoma espinocelular, também chamado de carcinoma de células escamosas, é uma neoplasia maligna, originária da camada epidérmica, a partir da diferenciação de queratinócitos (HEAD et al., 2002; VAIL & WITHROW, 2007).

Depois do sarcóide, o CEC é considerado a neoplasia mais comum na espécie equina, ocorrendo frequentemente em junções mucocutâneas, sendo a região do pênis e prepúcio a mais afetada (ARTHURS et al., 2020; HEAD et al. 2002).

As neoplasias em região de prepúcio e pênis são mais comuns em equinos do que em outros animais domésticos, mas não há grandes estudos disponíveis na literatura acerca da ocorrência de neoplasias em região genital de equinos machos (VAN TOP et al., 2008a).

Os animais com esse tipo de neoplasia, geralmente apresentam aumento de volume em pênis e/ou prepúcio, secreção purulenta ou sanguinolenta, balanopostite e dificuldade de exposição peniana, com consequente retenção urinária, caso ocorra obstrução uretral (PEREIRA et al, 2016). Além disso, apresentam lesões com placas despigmentadas, superfície irregular e úlceras com ou sem tecido de granulação (SILVA et al, 2015). Frequentemente, os tumores infiltram o corpo cavernoso e podem causar metástases em linfonodos regionais, mas as à distância são raras (NEWKIRK et al., 2014).

Não existem fortes evidências de que exista uma predisposição racial. Sugere-se que as possíveis causas do CEC sejam a idade avançada, castração (devido ao acúmulo de esmegma), cor da pelagem, superexposição à radiação solar, inflamação crônica, ocorrência de balanopostite e infecção por papilomavírus, principalmente o *Equus caballus* tipo 2 (EcPV-2) (PORCELLATO et al, 2020; RAHMSAUER et al, 2019; ZHU et al., 2015; VAN DEN TOP et al, 2010c; ELCE, 2009).

Após ser descrito pela primeira vez, o EcPV-2 foi detectado em muitos países da América do Norte, Europa e Ásia, mas não havia sido relatado em território nacional até o estudo realizado por Silva et al. (2022) em dois Serviços de anatomia patológica no Sul do país, diagnosticando o vírus e confirmando a ocorrência de infecção por EcPV-2 em equinos brasileiros.

O diagnóstico é realizado a partir dos sinais clínicos, punção aspirativa por agulha fina (PAAF), exame histopatológico e ultrassonografia. É importante realizar PAAF também nos linfonodos regionais, mesmo quando não aumentados de forma palpável, para um diagnóstico mais preciso de possíveis metástases (SILVA et al, 2015; VAN DEN TOP et al b, 2008).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com o sarcóide, pitiose, habronemose, tecido de granulação exuberante, estefanofilariose, papiloma e com o fibropapiloma, sendo a exclusão somente possível, por meio de exames laboratoriais (COELHO et al, 2012).

No exame histopatológico, as lesões de CEC possuem hiperplasia epidérmica, hiperqueratose, paraqueratose, acantose, proliferação e displasia de queratinócitos (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002). As lesões invadem a derme, podendo ou não haver proliferação ou espessamento da epiderme, com a presença de ilhas, cordões e trabéculas de células epiteliais neoplásicas, com variados graus de diferenciação celular (WEISS & FRESE, 1974).

As células da neoplasia são grandes, com formato ovóide e, frequentemente, contêm núcleo vesicular, com um único nucléolo central proeminente. O citoplasma varia de eosinofílico pálido a brilhante e os bordos das células são evidentes (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002).

O CEC pode ser classificado em uma das três categorias, de acordo com o grau de diferenciação celular sugerido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que são: pouco, moderadamente e bem diferenciado. As características de cada grau podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação do carcinoma espinocelular sugerida pela Organização Mundial da Saúde (OMS)

Classificação	Características
Pouco diferenciado	Células imaturas são maioria, grande quantidade de mitoses (atípicas e típicas), queratinização mínima
Moderadamente diferenciado	Pleomorfismo nuclear, ocorrência de mitose, pouca queratinização
Bem diferenciado	Muito semelhante ao epitélio escamoso normal

Fonte: Adaptado de Barnes et al., 2005

Cavalos com CEC pouco diferenciado geralmente possuem maior incidência de metástases regionais e, conseqüentemente, mau prognóstico, principalmente devido à invasão local e recidiva. Uma avaliação criteriosa do tumor primário, considerando o grau de diferenciação, invasividade, ocorrência de metástase e tamanho do tumor é extremamente importante para a escolha de um protocolo de tratamento eficiente (ARTHURS et al., 2020; VAN DEN TOP et al, 2010c; VAN DEN TOP et al, 2008b).

Os tratamentos podem ser realizados por meio de criocirurgia, excisão, penectomia parcial, penectomia total e remoção de linfonodos inguinais (TAYLOR & HALDORSON, 2013; VAN DEN TOP et al., 2008b).

O tratamento conservativo dificilmente apresenta bons resultados, sendo o tratamento cirúrgico mais eficiente e, muitas vezes, a única alternativa para que função e anatomia do órgão não sejam prejudicadas, ou que o paciente evolua para o óbito (RABBERS et al., 2014).

2.2 Apoptose

A apoptose é um processo fisiológico essencial, que desempenha um papel crítico no desenvolvimento e na homeostase tecidual em organismos multicelulares, mas que também é observada em diversos microrganismos eucarióticos, como leveduras e protozoários (SINGH et al, 2022; RODRIGUES et al, 2006).

É uma forma de morte celular programada, que é regulada por mecanismos de sinalização, que envolvem várias famílias de proteínas (por exemplo, caspases e proteínas inibidoras de apoptose) e proteases (BRENTNAL et al, 2013).

O desequilíbrio na apoptose pode contribuir para a proliferação ou crescimento celular anormal e, até mesmo, alterações autoimunes. Portanto, pode ser considerada uma condição significativa, que ajuda no desenvolvimento e crescimento normal das células, assim como na angiogênese (KASHYAP et al, 2021; OBENG, 2021; GOMES et a, 2007).

Em neoplasias malignas, a via apoptótica é inibida por diversos meios, incluindo superexpressão de proteínas antiapoptóticas e subexpressão de proteínas pró-apoptóticas. É de extrema importância compreender os mecanismos de apoptose a nível molecular, pois assim é possível ter uma visão mais aprofundada de diversos

processos que envolvem o estabelecimento de uma doença. Podendo, assim, influenciar a estratégia terapêutica, pois muitas dessas alterações causam resistência intrínseca à quimioterapia (PFEFFER & SINGH , 2018; AXAY et al, 2017).

Como consequência, pode auxiliar na criação de terapias antineoplásicas específicas, redução nos efeitos colaterais e desenvolvimento de novas terapias para diversas doenças degenerativas, como por exemplo, novas terapias antineoplásicas baseadas em compostos derivados de plantas que exibem atividade antineoplásica através da ativação da via apoptótica (GÖKBAYRAK ATAY et al, 2021; PFEFFER & SINGH, 2018).

A via apoptótica pode ser desencadeada de forma intrínseca ou extrínseca, por meio de sinais extracelulares de morte celular. As proteínas da família *B-cell lymphoma-2* regulam a morte celular programada. Sendo que BCL-2 e BCL-XL inibem a apoptose, enquanto outros, como BAX e BAK promovem a morte celular, havendo também envolvimento do fator de necrose tumoral (do inglês *Tumor Necrosis Factor - TNF*) e p53, que estão envolvidos e/ou colaboram no processo de apoptose. (KIRAZ et al, 2016; YOULE & STRASSER, 2008; BJELAKOVIC, 2005).

2.3 Adesão Celular

A homeostase em tecidos saudáveis depende fortemente da adesão celular e das interações da célula com a matriz extracelular. Por exemplo, as células epiteliais normais mantêm a estrutura do tecido, aderindo umas às outras e à matriz extracelular (JANISZEWSKA, et al, 2020).

As proteínas que fazem a mediação dessas interações distintas são chamadas coletivamente de moléculas de adesão celular e são divididas em quatro grupos principais: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas. Elas não apenas ancoram fisicamente as células, mas também integram criticamente a sinalização entre o microambiente extracelular e as células (JANISZEWSKA, et al, 2020; CAGNONI et al, 1993).

Há uma quantidade crescente de evidências que indicam que a adesão celular é um componente de grande importância na malignidade, progressão e

desenvolvimento de quimiorresistência em neoplasias. Além disso, alterações na adesão conferem um fenótipo invasivo e metastático (HARTMANN, 2022).

As moléculas de adesão influenciam na invasão das células tumorais nos tecidos que circundam o tumor primário e no extravasamento de células neoplásicas durante a metástase. Atuam também no posicionamento das células tumorais muito próximas às células imunes e estromais. Esse posicionamento permite o estabelecimento de conexões e comunicação intercelular, o que pode fazer com que o microambiente tumoral encare a neoplasia como algo normal (MAKRILIA et al, 2009).

A progressão do câncer é um processo que envolve diversas interações intercelulares e com a matriz extracelular, sendo composta por diversas etapas, nas quais algumas moléculas de adesão desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de metástases recorrentes, invasivas e distantes (OKEGAWA et al, 2004).

A perda da adesão intercelular e a descamação das células da lâmina própria subjacente permitem que as células malignas saiam de seu local de origem, degradem a matriz extracelular, adquiram um fenótipo de invasão mais móvel, invadam outros tecidos e causem metástase (DRIVALOS et al, 2011).

A metástase pode ser definida como um processo de crescimento tumoral em áreas distantes do foco primário das neoplasias malignas e pode ocorrer devido à perda da adesão celular e migração das células malignas pelo sistema circulatório e linfático (RIGUEIRO et al, 2018).

Além de participar na invasão e metástase do tumor, as moléculas de adesão regulam ou contribuem significativamente para várias funções, incluindo transdução de sinal, crescimento celular, diferenciação, expressão gênica específica do local, morfogênese, função imunológica, motilidade celular, cicatrização de feridas e inflamação (OKEGAWA et al, 2022).

2.3 Caspase-3

A apoptose é considerada um processo dependente de energia, cuidadosamente regulado, composto por características morfológicas e bioquímicas

específicas, nas quais a ativação da caspase desempenha um papel central (AXAY et al, 2017).

Diversos métodos foram desenvolvidos para identificar células em apoptose, baseados nas mudanças morfológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem durante esse processo. Nos estágios iniciais e finais da apoptose, o sinal bioquímico mais evidente é a ativação de proteases de cisteína, denominadas caspases (CHOUDHARY et al., 2015; MAZUMDER et al., 2008).

As caspases pertencem à família das endoproteases, que fornecem ligações importantes nas atividades celulares que controlam a inflamação e a apoptose. A ativação de caspases apoptóticas resulta na inativação ou ativação de substratos e gera uma cascata de eventos nos componentes celulares. A desregulação das caspases é um fator de extrema relevância nas doenças humanas, incluindo as neoplasias. A criação de terapias eficientes para esse tipo de alteração exige o entendimento de como essas enzimas funcionam e como elas podem ser controladas (MCLLAIN et al, 2013).

As caspases podem ser classificadas como iniciadoras ou efetoras, sendo de 14 tipos diferentes, nos mamíferos. As efetoras, quando ativadas, tornam o processo de apoptose irreversível. Fazem parte desse grupo, as Caspases 3, 6 e 7 (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000; PORTER & REINER, 1999).

A Caspase-3 ativa participa também da clivagem de várias proteínas que participam do reparo do DNA, do ciclo celular, do citoesqueleto celular e da organização nuclear (CHANG; YANG, 2000; GRUTTER, 2000). O aumento na detecção de lesões do DNA está diretamente relacionado com a taxa de apoptose (PEREZ et al., 2007).

Quando ocorre a ativação dos mecanismos de reparo, o processo de apoptose é interrompido, devido ao alto requerimento energético de ambos os processos (CHANG; YANG, 2000).

Considerada por alguns autores como um componente crítico da cascata de apoptose, a Caspase-3 inibe a produção de espécies reativas de oxigênio, é necessária para a execução eficiente da apoptose e quando sua expressão está desregulada em um processo de carcinogênese, pode indicar a progressão da doença (BRENTALL et al, 2013; VICKERS et al, 2013; LIANG et al, 2001; WINTER et al., 2001; PORTER & JÄNICKE, 1999).

Devido ao seu papel fundamental no processo de apoptose, a Caspase-3 torna-se um alvo primário para o tratamento de neoplasias malignas. Existem inúmeros relatos sobre compostos químicos que têm sua citotoxicidade mediada por Caspase-3 (YADAV et al., 2021).

2.4 E-caderina

As caderinas são proteínas transmembranares que se associam à actina, por meio de outras proteínas citoplasmáticas. Possuem estruturas diversificadas e diversas funções. Quando interagem entre si, parecem influenciar respostas biológicas de maneiras complexas e versáteis (ROY, 2014).

Dentre elas, está a E-caderina, com funções de grande importância no comportamento das células epiteliais, síntese de tecidos e supressão do câncer (ROY & BERX, 2008). Diversas moléculas de sinalização e fatores de transcrição regulam sua expressão (BARANWAL & ALAHARI, 2009).

Foi relatado que a perda de E-caderina induz a transição epitelial-mesenquimal em vários tipos de neoplasias, sendo sua perda utilizada para o diagnóstico e prognóstico de neoplasias epiteliais (ROY, 2014; BARANWAL & ALAHARI, 2009). Mais especificamente, em carcinomas, a perda seletiva de E-caderina pode causar desdiferenciação e infiltração. Sendo devido a isso, considerada como um supressor tumoral (SINGHAI et al, 2011).

A perda funcional de E-caderina tem sido associada a um mau prognóstico e sobrevida em pacientes portadores de diversos tipos de neoplasias malignas. Sua expressão tem sido associada à redução da invasividade, inibição do crescimento, apoptose, interrupção do ciclo celular e diferenciação. Estudos sobre alguns tipos de neoplasias mostraram que essas diferentes funções celulares também são interdependentes (MENDONSA et al, 2018; WONG et al, 2018).

Onder et al (2008), realizaram um estudo, no qual utilizaram dois métodos para investigar a base molecular da E-caderina, no que diz respeito à diminuição da adesão celular e à ocorrência de metástases. Isso foi realizado por meio da inibição da função de adesão célula-célula da E-caderina e das funções de sinalização intracelular. Os autores concluíram que a interrupção dos contatos célula-célula por si

só, não ocasiona a metástase, mas é necessária a perda de E-caderina para que ocorra a metástase. Além disso, a análise da expressão gênica mostra que a perda de E-caderina resulta na indução de múltiplos fatores de transcrição, sendo, pelo menos um deles, necessário para que ocorra a metástase induzida pela perda de E-caderina.

Em caso de carcinomas ductais invasivos, por exemplo, a expressão anormal de E-caderina, além de frequente, também é expressa de forma consistente em metástases distantes, muitas vezes mais fortemente do que no tumor primário, o que torna as células metastáticas ainda mais aderidas ao local (KOWALSKI et al, 2003).

O estudo da importância das caderinas no início ou na supressão de neoplasias, é um campo novo da pesquisa molecular dos tumores, mas sabe-se que, em células neoplásicas, a perda da expressão do gene da E-caderina causa disfunção do sistema de junção celular, desencadeando a invasão neoplásica e a ocorrência de metástase (ROY, 2014; LIU et al., 2005).

A ausência da adesão celular durante a progressão do tumor é um evento muito importante durante o estágio inicial da doença e na ocorrência de metástases. Apesar de recente, seu estudo é de extrema importância, pois a transição de tecido epitelial para mesenquimal, demonstra ser crucial na tumorigênese, aumentando a ocorrência de metástase, a quimiorresistência e a extensão do tumor (LOH et al,2019; ROY, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização da neoplasia

Foram avaliadas neoplasias de 20 equinos (*Equus caballus*) diagnosticados com carcinoma espinocelular no pênis, provenientes da rotina do Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O exame histopatológico foi realizado utilizando fragmentos das neoplasias que foram coletados, por excisão cirúrgica ou *punch*, para realização de biópsias e

conservadas em blocos de parafina, para confecção de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE).

As neoplasias foram avaliadas microscopicamente e classificadas de acordo com o grau de malignidade (diferenciação celular, presença de mitoses, formato das células, cromatina, relação núcleo:citoplasma e nucléolos) e presença de pérolas de queratina. Além disso, tamanho, formato e características de núcleo e citoplasma, aparência de estroma e infiltrado inflamatório também foram avaliados.

3.2 Análise imuno-histoquímica

Cortes das neoplasias em parafina foram imunomarcados por meio da técnica de imuno-histoquímica. Foram utilizados os anticorpos anti-E-caderina e anti-Caspase-3, cujos detalhamentos estão descritos na tabela 2.

O protocolo foi composto por:

- Desparafinização dos cortes em estufa a 60°C por 1 hora;
- Hidratação dos cortes em soluções decrescentes de xilol e álcool e lavagem em água corrente;
- Recuperação antigênica em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0), em *Streamer*, a 60°C por 60 minutos
- Bloqueio da peroxidase endógena, utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 60 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura;
- Bloqueio das reações inespecíficas, com leite Molico® a 8% (92 mL de água destilada e 8mL de leite Molico®) por 60 minutos, à temperatura ambiente;
- Incubação dos cortes com anticorpo primário, em diluição específica (tabela 2), e tempo de incubação de 18 horas a 4°C;
- Incubação dos cortes com o anticorpo secundário por 1 hora, à temperatura ambiente (tabela 2);
- Utilização do cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – Dakocytomation (cód. K3468- 1) para revelar a reação.

A solução tampão Tris HCl (pH 7,9) foi utilizada entre cada um dos passos descritos anteriormente, para lavagem.

- A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan® (Merck, cód. HX888585).

Como controle negativo, foi excluído o anticorpo primário da reação, utilizando-se apenas o diluente de anticorpo (Dakocytomation, cód. S302283-2). Já, para o controle positivo, foram utilizados tecidos neoplásicos (carcinoma).

Para quantificar a imunomarcação em cada corte, foram contadas as células marcadas em cinco campos aleatórios, no aumento de 400X (microscópio Nikon Eclipse E200). A partir dos valores obtidos nestes campos, calculou-se uma média do número de células epiteliais imunomarcadas por lâmina.

Tabela 2 – Anticorpos primários, anticorpos secundários, marcação celular e forma de recuperação antigênica utilizados na reação imuno-histoquímica de carcinomas espinocelulares penianos em equinos.

Anticorpo primário	Marcação celular	Recuperação antigênica	Diluição	Anticorpo secundário	Origem/Marca/Código
Anti-Caspase-3	Apoptose	Streamer a 60°C por 60 minutos	1:400	EnVision® ¹	Coelho/policlonal/Rheabiotec/IM0035
Anti-E-caderina	Adesão celular	Streamer a 60°C por 60 minutos	1:100	EnVision® ¹	Coelho/policlonal/Rheabiotec/IM0066

¹ Kit EnVision® (Dakocytomation, código K4065).

Fonte: Autoria própria (2023)

3.3 Análise estatística

A média da contagem de células epiteliais imunomarcadas das neoplasias foi submetida ao teste de Shapiro-Wilk e de homocedasticidade dos dados para verificar se possuíam um padrão de distribuição normal. O resultado evidenciou que a distribuição dos dados não era normal, diante disso realizou-se a Correlação de Kendall (nível de significância $p < 0,05$) para verificar se a correlação entre a expressão de E-caderina e Caspase-3 e do grau de diferenciação com a idade do animal.

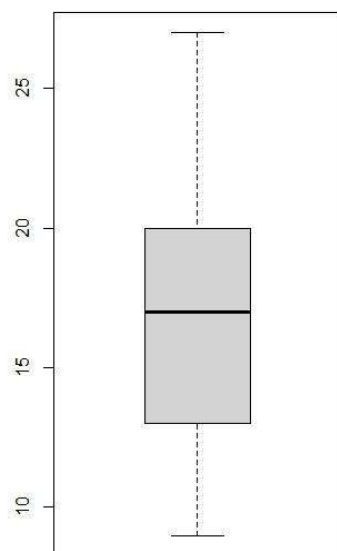
Para verificar a hipótese de diferença na expressão da E-caderina e da Caspase-3 nos CECs de acordo com o seu grau de diferenciação, utilizou-se o teste não paramétrico Mann-Whitney (nível de significância $p < 0,05$).

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* R® (Foundation for Statistical Computing, versão 4.1.3).

4 RESULTADOS

A população estudada consistiu em 20 equinos com idade média de 16,8 anos, com mediana de 17 anos, sendo que considerando o grau de diferenciação, os animais com CEC bem diferenciados apresentaram uma idade média de 16 anos e os animais com CEC moderadamente diferenciados, apresentaram média de idade de 19 anos. Não foram observados *outliers*, como pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1- Boxplot baseado na idade dos equinos que apresentaram CEC peniano e foram avaliados pelo Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da FMVZ/USP

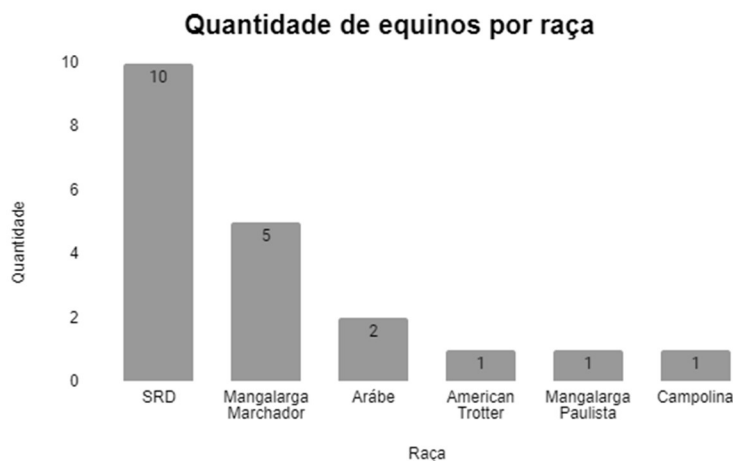


Fonte: Autoria própria (2023).

Quanto à pelagem, os equinos possuíam pelagem caracterizada como Alazã em 30% dos animais (6/20), 35% (7/20) Castanha, 15% (3/20) Tordilho, 10% (2/20) Pampa, 5% (1/20) Baio e 5% (1/20) Rosilho (Gráfico 2). Quanto ao animal ser ou não castrado, obteve-se a informação apenas de seis deles. Desses, quatro (4/6) eram castrados e dois eram inteiros (2/6).

Os animais eram de seis raças diferentes, sendo: 50% (10/20) Sem Raça Definida (SRD), 25% (5/20) Mangalarga Marchador, 10% (2/20) Árabe, 5% (1/20) American Trotter, 5% (1/20) Mangalarga Paulista e 5% (1/20) Campolina (gráfico 2).

Gráfico 2- Raça dos equinos com carcinoma espinocelular peniano atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo



Fonte: Autoria própria (2023).

A grande maioria dos animais, 80% (16/20), passou pelo procedimento de penectomia parcial, sendo que em 10% (2/20) também foi realizada orquiectomia e em outros 10% (2/20) nenhum tratamento foi realizado.

Quanto ao desfecho clínico, 80% (16/20) recebeu alta após o procedimento cirúrgico e 20% (4/20) foi a óbito. Em dois casos, os proprietários optaram por realizar a eutanásia, sendo que em um deles o animal também estava acometido por leptospirose. Nos outros dois casos, um dos animais apresentou um quadro de cólica durante a internação e descobriu-se que possuía também um adenocarcinoma intestinal, sendo essa a causa do desfecho. Um dos animais foi abandonado, não recebendo nenhum tipo de tratamento específico para o CEC.

As características clínicas dos animais incluídos neste estudo estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Características clínicas dos equinos com CEC peniano que foram avaliados pelo Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da FMVZ/USP

Animal	Raça	Idade	Pelagem	Tratamento	Desfecho clínico
1	SRD	26	Alazã	Penectomia parcial	Alta
2	Mangalarga Marchador	20	Castanho	Penectomia parcial	Alta
3	American Trotter	9	Castanho	Penectomia parcial	Alta
4	Mangalarga Paulista	19	Alazã	Penectomia parcial e orquiectomia	Alta

5	SRD	9	Tordilho	Penectomia parcial	Eutanásia
6	Mangalarga Marchador	16	Pampa	Penectomia parcial e orquiectomia	Alta
7	SRD	13	Baio	Penectomia parcial	Alta
8	SRD	25	Castanho	Penectomia parcial	Alta
9	SRD	17	Alazã	Penectomia parcial	Alta
10	SRD	13	Castanho	Penectomia total e Uretrostomia perineal	Alta
11	Árabe	15	Tordilho	Penectomia parcial	Alta
12	SRD	17	Castanho	Penectomia parcial	Óbito (cólica - adenocarcinoma intestinal)
13	Mangalarga Marchador	21	Pampa	Penectomia parcial	Alta
14	SRD	20	Castanho	Penectomia parcial	Alta
15	Mangalarga Marchador	17	Castanho	Nenhum	Eutanásia (lesão em escroto e leptospirose)
16	Mangalarga Marchador	9	Rosilho	Nenhum	Óbito (abandono)
17	SRD	27	Tordilho	Penectomia parcial	Alta
18	Árabe	18	Alazã	Penectomia parcial	Alta
19	SRD	11	Alazã	Penectomia parcial	Alta
20	Campolina	15	Alazã	Penectomia total e Uretrostomia perineal	Alta

Fonte: Autoria própria (2023).

Das neoplasias analisadas, 65% eram bem diferenciadas (13/20) e 35% moderadamente diferenciadas (7/20). Havia pérolas córneas em 85% das amostras (17/20) e em 15% (3/20) elas estavam ausentes. Necrose e hemorragia estavam presentes em 30% (6/20) das amostras e ausentes em 70% (14/20), sendo que em 15% (3/20) ambas estavam presentes na mesma amostra. Na maioria das amostras, 60% (12/20), úlcera estava presente, havendo, em dois casos, muitas bactérias no local. Figuras de mitose estavam presentes em 85% das amostras (17/20) e ausentes em 15% (3/20), todos casos de CEC bem diferenciado. O infiltrado inflamatório era difuso em 45% (9/20) dos casos, multifocal em 45% (9/20) e focal em 10% (2/20) (tabela 4).

Tabela 4 - Características histopatológicas das neoplasias avaliadas que foram avaliadas pelo Serviço de Patologia Animal do Hospital Veterinário da.FMVZ/USP

Animal	Grau de diferenciação	Mitose	Infiltrado inflamatório	Necrose	Hemorragia
1	Moderadamente diferenciado	Presente (moderada)	Linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, moderado e difuso	Presente	Presente
2	Moderadamente diferenciado	Presente (moderada)	Mononuclear, discreto e multifocal	Presente	Ausente
3	Bem diferenciado	Presente (moderada)	Mononuclear, moderado e difuso	Ausente	Ausente
4	Bem diferenciado	Presente (raras)	Neutrofílico, moderado e difuso	Presente	Ausente
5	Bem diferenciado	Ausente	Neutrófilo, macrófagos, plasmócitos e linfócitos, moderado e multifocal.	Presente	Ausente
6	Bem diferenciado	Presente (moderada)	Neutrofílico moderado e difuso	Ausente	Ausente
7	Bem diferenciado	Presente (moderada)	Linfoplasmocitário, discreto e multifocal	Presente	Presente
8	Bem diferenciado	Presente (moderada)	Mononuclear, discreto, difuso	Ausente	Presente
9	Bem diferenciado	Ausente	Mononuclear, moderado e difuso	Ausente	Presente
10	Bem diferenciado	Ausente	Polimorfo, discreto e multifocal	Ausente	Presente
11	Bem diferenciado	Presente (raras)	Eosinófilos e macrófagos, acentuado e multifocal	Ausente	Ausente
12	Bem diferenciado	Presente (moderada)	Linfoplasmocítico, discreto e focal	Ausente	Ausente
13	Bem diferenciado	Presente (raras)	Mononuclear, moderado e multifocal	Ausente	Ausente
14	Bem diferenciado	Presente (raras)	Eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, discretos e multifocal	Ausente	Ausente
15	Moderadamente diferenciado	Presente (raras)	Linfocítico, discreto e difuso	Ausente	Ausente
16	Moderadamente diferenciado	Presente (raras e atípicas)	Linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, moderado e difuso	Presente	Presente

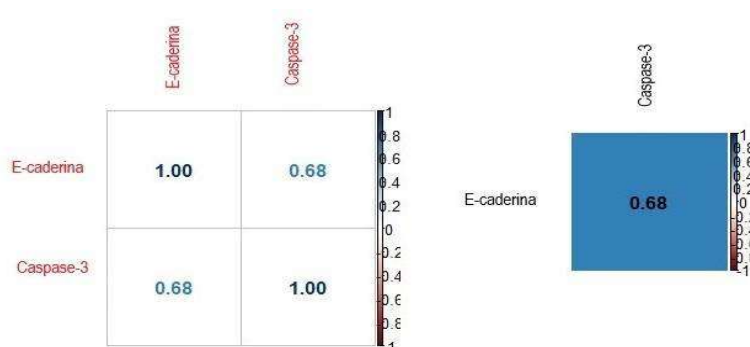
17	Moderadamente diferenciado	Presente (raras)	Mononuclear, discreto e multifocal	Ausente	Ausente
18	Moderadamente diferenciado	Presente (raras)	Macrófagos e eosinófilos, discreto e multifocal	Ausente	Ausente
19	Bem diferenciado	Presente (raras)	Neutrófilico, moderado e difuso	Ausente	Ausente
20	Moderadamente diferenciado	Presente (moderada)	Linfoplasmocítico discreto, focal	Ausente	Ausente

Fonte: Autoria própria (2023).

Em uma das amostras avaliadas um êmbolo neoplásico foi encontrado em um vaso linfático, em um CEC moderadamente diferenciado. O desfecho desse animal foi a eutanásia, devido à leptospirose e lesão no escroto. Também foi encontrada melanina em uma pérola córnea de uma das amostras. Nenhum tratamento foi realizado, pois o animal foi abandonado pelo proprietário e evoluiu para óbito.

Por meio do Coeficiente de Correlação de Kendall, verificou-se que existe correlação positiva, estatisticamente significativa, entre a expressão de E-caderina e de Caspase-3 nas amostras do estudo. Os valores podem ser observados na Figura 1.

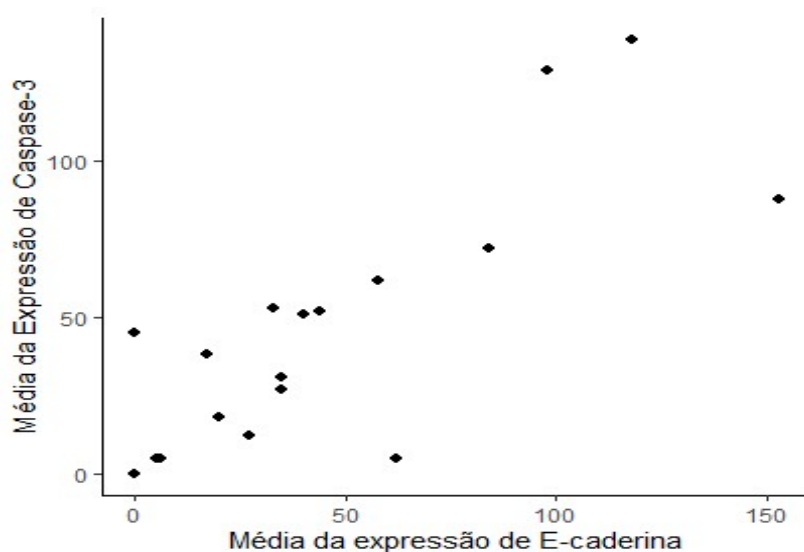
Figura 1 - Matriz de correlação da expressão de E-caderina e Caspase-3



Fonte: Autoria própria (2023).

A relação dos valores das médias de expressão dos imunomarcadores de cada amostra encontra-se no gráfico de dispersão (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Gráfico de dispersão com os valores médios de células que foram expressas



Fonte: Autoria própria (2023).

No que se refere à correlação entre idade e grau de diferenciação, não se encontrou correlação estatisticamente significativa, bem como na expressão de E-caderina ($p = 0,4497$) e Caspase-3 ($p = 0,7505$) de acordo com o grau de diferenciação das neoplasias.

5 DISCUSSÃO

A idade média dos animais dos animais do presente trabalho foi de 16,8 anos, com mediana de 17 anos. Em estudo realizado por Valentine et al (2006) comparando a idade média de equinos com diferentes tipos de CEC, obteve-se como resultado 13 anos para o ocular, 15 anos para o de pele e 21 anos para pênis e prepúcio. Knight et al (2011) obteve uma média de 23,9 anos, enquanto no estudo feito por Mair (2000), a idade média dos animais com CEC era de 17,4 anos, corroborando os achados do presente trabalho.

Não há como afirmar que a idade dos animais se relaciona com o grau histológico, pois não se encontrou correlação estatisticamente significativa nesse estudo e o mesmo foi evidenciado por Vieira et al (2020), que também não encontraram correlação com o avanço da neoplasia.

No presente estudo, 50% dos animais (10/20) eram Sem Raça Definida e o artigo de Ramos et al (2007) teve animais SRD como maioria. No entanto, mesmo diante dessa proporção, não é possível afirmar que existe predisposição racial, pois isso pode ser devido a uma alta prevalência de animais SRD. Knowles et al (2021) e Carvalho et al (2012) não encontraram nenhuma predisposição racial específica.

Hendrix (2005) afirma que animais com pelagens mais claras são mais susceptíveis a esse tipo de neoplasia do que os que possuem pelagens escuras, devido à falta de pigmento fotoprotetor na pele. No presente estudo, não é possível afirmar que houve maior prevalência em animais de pelagem clara, pois foi possível obter apenas o tipo de pelagem, mas não sua variedade, que pode ser clara e/ou escura, em grande parte dos casos.

Não foi possível saber a quantidade de animais castrados e inteiros, pois a informação estava disponível em apenas em 30% dos casos (6/20). Desse total, 66% (4/6) era castrado e 34% (2/6) inteiro. Segundo Taylor & Haldorson, a maior incidência de CEC ocorre em cavalos machos castrados, corroborando o achado.

Quanto ao grau histológico, 65% (13/20) eram bem diferenciados e 35% (7/20) eram moderadamente diferenciados, nenhuma das neoplasias foi caracterizada neste estudo como pouco diferenciada. No estudo de Arthurs et al (2020), 39% (13/33) dos casos eram neoplasias bem diferenciadas, enquanto 61% (20/33) eram pouco diferenciadas. Ao mesmo tempo em que Ramos et al (2007) obtiveram 55,56% de CECs bem diferenciados, correspondendo à maior parte da amostra, corroborando os presentes achados.

Um êmbolo neoplásico foi encontrado em um vaso linfático, em um CEC moderadamente diferenciado. Quando atingem a circulação, esses êmbolos podem ser neutralizados pelo sistema imunológico ou se multiplicar à distância, causando metástase. O ritmo de crescimento dos êmbolos, quando se fixam em outro local se deve, basicamente, à proliferação celular (BARROS & BUZAID, 2006).

No estudo de Guin (2010) foram encontrados êmbolos em vasos linfáticos em 2% (1/50) dos casos. A presença desses êmbolos, tanto em vasos sanguíneos, quanto nos linfáticos, não apresentou relação estatística significativa com o grau histológico da neoplasia ($p=0,94$).

A grande maioria das amostras apresentou figuras de mitose, independente do grau de diferenciação do CEC. A avaliação visual de figuras mitóticas

em cortes histológicos na rotina é um método padrão-ouro para avaliar a atividade proliferativa e a gradação do tumor (IBRAHIM et al, 2022).

A divisão celular desregulada é um ponto central em neoplasias malignas, pois o aumento da mitose causa proliferação excessiva de células, que pode ser observada em carcinomas (SUBASHINI, 2019; XIA et al, 2008).

Havia mitoses atípicas em 5% (1/20) dos casos, sendo o CEC moderadamente diferenciado. A maioria dos tumores com figuras mitóticas atípicas apresenta alguma forma de instabilidade cromossômica, e são frequentemente observadas em tumores altamente proliferativos e agressivos. A identificação de mitoses atípicas também é de grande valia na distinção entre tumores benignos e malignos, juntamente com outros critérios (IBRAHIM et al, 2022).

O infiltrado inflamatório difuso e multifocal foi observado em 90% (18/20) dos casos, havendo, em muitos casos, a presença de linfócitos. Alguns estudos destacam que a presença de linfócitos pode indicar uma resposta protetora ou uma atividade citotóxica contra a neoplasia (SANTANA et al., 2016).

Em 30% (6/20) dos casos havia necrose, sendo 50% (3/6) em CEC bem diferenciado e 50% (3/6) em CEC moderadamente diferenciado. A necrose é uma alteração patológica comum em carcinoma de células escamosas, em especial em tumores grandes, pouco diferenciados e com crescimento rápido (LI et al, 2021).

A necrose tumoral é comumente observada em regiões centrais dos tumores, como resultado de vascularização inadequada e subsequente estresse metabólico, como hipóxia e privação de nutrientes. É frequentemente associada ao desenvolvimento tumoral agressivo e metástase, sendo considerada uma indicação de mau prognóstico (LIU & JIAO, 2021).

Todos os animais, exceto os que foram a óbito, passaram por procedimento cirúrgico. Sabe-se que essa é a base do tratamento localmente invasivo, pois a ressecção da lesão primária não só retira a neoplasia, mas também fornece estadiamento patológico definitivo, sem o risco de subestadiamento e de falta de heterogeneidade intratumoral, que pode ocorrer na biópsia incisional ou punção aspirativa (THOMAS et al, 2021).

Rizk et al (2013), realizaram penectomia parcial, com uma versão ligeiramente modificada da técnica de Williams, em 15 casos de CEC, obtendo resultados satisfatórios, ressaltando que o tratamento é eficaz quando a neoplasia

estiver confinada à glândula e corpo do pênis e quando não houver disseminação proximal do prepúcio e linfonodos regionais.

Sabe-se que a expressão de moléculas de adesão, como E-caderina, é consideravelmente menor nas neoplasias malignas, quando comparada aos tecidos normais (ARMANDO et al, 2021).

Em estudo realizado por Oka et al (1993) em 120 neoplasias mamárias malignas, para verificar a expressão de E-caderina de acordo com o tipo e grau de diferenciação da neoplasia, as células epiteliais normais a expressaram fortemente nos limites célula-célula, enquanto vários padrões de coloração foram observados nas neoplasias.

Essas evidências sugerem que a redução da expressão da E-caderina pode desempenhar um papel importante na invasão, metástase e prognóstico desfavorável (BREMNES et al, 2022; NA et al, 2020). Frente a isso, é importante sabermos se há diferença dessa expressão, de acordo com o grau de diferenciação ou malignidade das mesmas.

A imunorreatividade da E-caderina foi correlacionada com os graus de diferenciação e com as características clínico-patológicas em carcinomas de células escamosas oral, evidenciando que ela desempenha um importante papel na progressão desse tipo de neoplasia (KAUR et al, 2009). Apesar disso, no presente estudo não encontramos esse tipo de correlação.

A expressão de Caspase-3 está presente em tecidos humanos normais, a superexpressão e a perda da expressão da Caspase-3 foram relatadas em diversas neoplasias malignas em humanos (LIU et al, 2004).

Huang et al (2017) analisaram 185 amostras de carcinoma de células escamosas da mucosa oral em humanos e verificaram que a expressão de Caspase-3 foi associada a um estágio avançado da neoplasia e a um tamanho tumoral maior.

Yang et al (2018) realizaram uma metanálise de 3.091 casos para verificar a associação da expressão de Caspase-3 e parâmetros clínicos e patológicos em neoplasias mamárias malignas e nenhuma evidência mostrou que a expressão aumentada de Caspase-3 foi estatisticamente correlacionada com o estado de diferenciação tumoral (baixo/moderado ou alto) ou metástase em linfonodos.

Neoplasias raras em humanos, como o CEC peniano, têm sido amplamente negligenciadas na pesquisa urológica em favor de doenças mais comuns. Porém, o câncer de pênis representa um problema crescente para os sistemas de saúde em

nível mundial, porque a falta de conhecimento, a centralização ineficaz do atendimento e a ausência de fundos de pesquisa dificultam a melhoria do atendimento global aos pacientes (BANDINI et al,2022)

A falta de um modelo animal validado limitou avanços significativos em relação à patogênese e possíveis alvos terapêuticos de neoplasias penianas malignas em humanos. Diante disso, é de extrema importância que mais estudos relacionados a esse tipo de neoplasia em animais sejam realizados (SHABBIR et al, 2014).

6 CONCLUSÕES

O CEC peniano ocorreu em animais idosos, com média de idade próxima a 18 anos, sem predileção por raça ou cor da pelagem.

Os pacientes foram tratados, quase em sua totalidade, por meio de penectomia parcial e evoluindo para alta.

Nas amostras avaliadas, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão dos imunomarcadores para Caspase-3 e E-caderina, de acordo com os graus de diferenciação, bem como não houve correlação estatisticamente significativa entre idade e grau de diferenciação.

Houve correlação positiva, estatisticamente significativa, na expressão de E-caderina e Caspase-3.

REFERÊNCIAS

ARMANDO, F.; MECOCCI, S.; PORCELLATO, I.; CAPPELLI, K.; MECHELLI, L.; BRACHELENTE, C.; PEPE, M.; GHELARDI, A.; PASSERI, B.; RAZZUOLI, E. Investigation of the Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Process in Equine Papillomavirus-2 (EcPV-2)-Positive Penile Squamous Cell Carcinomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.19, p.1-15.

ARTHURS, C.; SUAREZ-BONNET, A.; WILLIS, C.; XIE, B.; MACHULLA, N.; MAIR, T.S.; CAO, K.; MILLAR, M.; THRASIVOULOU, C.; PRIESTNALL, S.L.; AHMED, A. Equine penile squamous cell carcinoma: Expression of biomarker proteins and EcPV2. **Science Reports**, v.10, n.1, p.1-13, 2020.

AXAY, J.; HAQUE, N.; LATEEF, A.; PATEL, A.; PATEL, P. Apoptosis and Its Role in Physiology. **International Journal of Livestock Research**, v.7, n.10, p.33-45, 2017.

BACCARIN, R.Y.A.; SILVA, L.C.; BELLI, C.B.; FERNANDES, W.R.; ZOPPA, A.L.V. Ocorrência de neoplasias em 15 anos de atendimento hospitalar de equídeos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 439-445, 2011.

BANDINI, M; AHMED, M.; BASILE, G.; WATKIN, N.; MASTER, V.; ZHU, Y.; PRAKASH, G.; RODRIGUEZ, A.; SSEBAKUMBA, M.K.; LENI, R.; CIRULLI, G.O.; AYRES, B.; COMPITELLO, R.; PEDERZOLI, F.; JOSHI, P.M.; KULKARNI, S.B.; MONTORSI, F.; SONPAVDE, G.; NECCHI, A.; SPIESS, P.E. A global approach to improving penile cancer care. **Nature Reviews Urology**, v. 19, n.1, p.231–239, 2022.

BARANWAL, S.; ALAHARI, S.K. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.384, n. 1, p.6-11, 2009.

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

BARROS, ALC; BUZAID, A.C. História natural do câncer de mama. **Revista Brasileira de Mastologia**, v,16, n.4, p.170-175, 2006.

BJELAKOVIC, G.; NAGORNI, A.; BJELAKOVIC, M.; STAMENKOVIC, I.; ARSIĆ, R.; VUKA, K. Apoptosis: Programmed cell death and its clinical implications. **Facta Universitatis: Series Medicine and Biology**, v.12, n.1, p.6-11, 2005.

BOGAERT, L.; WOLLEMSSEN, A.; VANDERSTRAETEN, E.; BRACHO, M.A.; DE BAERE, C.; BRAVO, I.G.; MARTENS, A. EcPV2 DNA in equine genital squamous cell

carcinomas and normal genital mucosa. **Veterinary Microbiology**, v. 6, n.158, p.33-41, 2012.

BREMNES, R.M; VEVE, R.; HIRSCH,F.R.; FRANKLIN, W.A. The E-cadherin cell–cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. **Lung Cancer**, v.36, n.2, p.115-124, 2002.

BRENTNALL, M.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; DE GUEVARA, R. L. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **BMC Molecular and Cell Biology**, v.14, n.32, p.14-32, 2013.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Diseases**, v.4, n.2, p.70-77, 1998.

CAGNONI, LM.; GHERSETICH, I.; LOTTI, T. Cell adhesion molecules in inflammatory and neoplastic skin diseases. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v.2, n.2, p.94-112, 1993.

CARVALHO, F.K.L; DANTAS, A.F.M; RIET-CORREA,F .; MIRANDA NETO, E.G.; SIMÕES, S.V.D.; AZEVEDO, S.S. Fatores de risco associados à ocorrência de carcinoma de células escamosas em ruminantes e equinos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.9, p.881-886, 2012.

CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 64, n.4, p. 821-846, 2000.

CHOUDHARY, G.S., AL-HARBI, S., ALMASAN, A. Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. In: MOR, G.; ALVERO, A. **Apoptosis and Cancer: Methods in Molecular Biology**. New York:Humana Press, 2015. 2 ed. Vol 1219, p.1-9.

COELHO, C.M.M.; SILVA, O.C.; SILVA, L.A. F.; RABELO, R.E.; ORLANDO, C.F.P.; ARAÚJO, I.L.F. Enfermidades cirúrgicas do aparelho reprodutor masculino equino: aspectos clínicos e terapêuticos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, v.18, n. 55, p. 58-66, 2012.

CORRÊA, M. P.D; GOLLNER, A.M.; GUERRA, M. C. S.; FERREIRA, A. P.; RODRIGUES, M. F. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.84, n.6, p:606-14, 2009.

DRIVALOS, A.; PAPATSORIS, A.G.; CHRISOFOFOS, M.; EFSTATHIOU, E.; DIMOPOULOS, M.A. The role of the cell adhesion molecules (integrins / cadherins) in prostate cancer. **International Brazilian Journal of Urology**, v.37, n.3, p.302-306, 2011.

ELCE, Y. The aetiopathogenesis of squamous cell carcinomas in horses. Where are we? **Equine Veterinary Education**, v.21, n.1, p.17–18, 2009.

FERNANDES, A. P. S. **Estudo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e N-caderina em câncer de mama**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Porto Alegre.

GOLDSCHMIDT M.H. & HENDRICK M.J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN D.J. **Tumors in Domestic Animals**. Ames: Iowa State Press, 2022. 4 ed., p.45-117.

GOMES, M.J.; RIBAS-FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; CZECKO, N.G.; RIBAS, C.A.P.M.; NASSIF, A.N.; BITTENCOURT, L.P.M. Avaliação da expressão do Caspase-3 no adenocarcinoma colorretal através de um sistema computadorizado de análise de imagem. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v.21, n.1, p.33-37, 2008.

GOOSSENS, N.; NAKAGAWA, S.; SUN, X.; HOSHIDA, Y. Cancer biomarker discovery and validation. **Translational Cancer Research**, v.4, n.3, p.256-269, 2015.

GRUTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. **Current Opinion Structure Biology**, v.10, n.6, p.649-655, 2000.

GUIN, T.N. **Avaliação da sobrevida e de marcadores histomorfológicos da sobrevida como potenciais fatores prognósticos para carcinoma de células escamosas em cães e gatos**. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Pelotas Faculdade. Pelotas.

HUANG, J.S.; YANG, C.M.; YANG, C. M.; WANG, J.S.; LIOU, H. H.; HSIEH, I.C.; LI, G. C.; HUANG, S. J.; SHU, C.W.; FU, T.Y.; LIN, Y.C.; GER, L.P.; LIU, P.F. Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.8, n.8, p.84237-84247, 2017.

HARTMANN, T.N. Editorial: Metabolism and Cell Adhesion in Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.10, n.1, p.1-2, 2022.

HENDRIX, D.V.H. Equine Ocular Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Techniques In Equine Practice**, v.4, n.1, p.87-94, 2005.

HUANG, J., YANG, C., WANG, J., LIOU, H.; HSIEH, I.; LI, G.; HUANG, S., SHU, C.; FU, T.; LIN, Y.; GER, L.; LIU, P. Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v.8, n.1, p.84237-84247, 2017.

IBRAHIM, A.; LASHEN, A, TOSS, M; MIHAI, R.; RAKHA, E. Assessment of mitotic activity in breast cancer: revisited in the digital pathology era. **Journal of Clinical Pathology**, v.75, n.1, p.65–372, 2022

JANISZEWSKA, M.; PRIMI, M.C.; IZARD, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. **Journal of Biology Chemistry**, v.21, n.295, p. 2495-2505, 2020.

JOAO, C.F.; COSTALL, M.T.; CARDILLI, D.J.; FARIA, J.L.; MAGALHÃES, G.M.; ALESSI, A.C. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. **Ciência Rural**, v. 41, n. 9, p.1611- 1616, 2011.

KASHYAP, D.; GARG, V.K.; GOEL, N. Chapter Four - Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. In: DONEV, R. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**. Ed.1. Amsterdã: Elsevier, 2021.V.125, p.

KAUR, G.; CARNELIO, S.; RAO, N.; RAO, L. Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study. **Indian Journal of Dental Research**, v.20, n.1, p.71-76, 2009.

KIRAZ, Y.; ADAN, A.; YANDIM, M. K.; BARAN, Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. **Tumor Biology**, v.37, n.7, p.8471–8486, 2016.

KNIGHT, C.G.; MUNDAY, J.S.; Peters, J.; DUNOWSKA, M. Equine Penile Squamous Cell Carcinomas Are Associated With the Presence of Equine Papillomavirus Type 2 DNA Sequences. **Veterinary Pathology**, v.48, n.6, p.1190-1194, 2011.

KNOWLES, E.J.; TREMAINE, W.H.; PEARSON, G.R.; MAIR, T.S. A database survey of equine tumours in the United Kingdom. **Equine Veterinary Journal**, v.48, n.1, p.280–284, 2016.

KOWALSK, P.J., RUBIN, M.A. & KLEER, C.G. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. **Breast Cancer Research**, v.5, n.6, p.R217-R222, 2003.

LI, L.; LING, Y.; GUO, C.; GUO, L.; YING, J. Necrosis Is Not the Main Part of Immune-Related Pathologic Response to Neoadjuvant Immunotherapy in Squamous Cell Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, v.18, n.1, p.e37-e39,2021.

LIANG, Y.; YAN, C.; SCHOR, N. Apoptosis in the absence of caspase 3. **Oncogene**, v. 20, n.1, p. 6570–6578, 2001.

LIU, Y.N.; LEE, W.W.; WANG, C.Y.; CHAO, T.; CHEN, Y.; CHEN, J.H. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. **Oncogene**, v.24, n.1, p.8277-8290, 2005.

LIU, Z.G.; JIAO, D. Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. **Cell Stress**. v.4, n.1, p.1-8, 2019.

LOH, C.-Y.; CHAI J.Y.; TANG, T.F.; WONG, W.F.; SETHI, G.; SHANMUGAM, M.K.; CHONG, P.P.; LOOI, C.Y. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-

Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, v.8, n.1118, p.1-33, 2019

MAKRILIA, N.; KOLLIAS, A.; MANOPOULOS, L.; SYRIGOS, K. Cell Adhesion Molecules: Role and Clinical Significance in Cancer. **Cancer Investigation**, n.27, v.10, p.1023-1037, 2009.

MCLLWAIN, D.R.; BERGER, T.; MAK, T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.5, n.4, p.1-28, 2013.

MAIR, T.S.; WALMSLEY, J.P.; PHILLIPS, T.J. Surgical treatment of 45 horses affected by squamous cell carcinoma of the penis and prepuce. **Equine Veterinary Journal**, v.32, n.5, p.406-410, 2000.

MARTINS, E.A.N.; TOLEDO, M.P.; MORAES, L.G.; MELLO, A.J.; COSTRIUBA, F.V.D.L.; MORAES, J. de; MADUREIRA, K. M.; TOJAL, J.H.; CONTIERE, M.B. Carcinoma de células escamosas em pênis equino: Relato de caso. **Revista de Ciências Veterinária**, v.5, n.5, p.1-6. 2007.

MAZUMDER, S.; PLESCA, D.;ALMASAN, A. Caspase-3 Activation is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. In: MOR, G;ALVERO, A.B. **Apoptosis and Cancer. Methods in Molecular Biology™**. Ed.2. New York: Humana Press, 2008. V.1219, p.1-9.

MECOCCI, S.; PORCELLATO, I.; ARMANDO, F.; MECHELLI, L.; BRACHELENTE, C.; PEPE, M.;GIALLETTI, R. PASSERI, B.; MODESTO, P.; GHELARDI, A.; CAPPELLI, K.; RAZZUOLI, E. Equine Genital Squamous Cell Carcinoma Associated with EcPV2 Infection: RANKL Pathway Correlated to Inflammation and Wnt Signaling Activation. **Biology (Basel)**, v.21, n. 10, p.244-251. 2021.

MENDONSA, A.M., NA, T.Y.; GUMBINER, B.M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. **Oncogene**, v.37, n.35, p.4769–4780, 2018.

NA, T.; SHECTERSON, L.; MENDONSA, A.M.; GUMBINER, B.M. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.117, n.11, p.5931-5937.

NEWKIRK, K.M.; HENDRIX, D.V.; ANIS, E.A.; ROHRBACH, B.W.; EHRHART, E.J.; LYONS, J.A.; KANIA, S.A. Detection of papillomavirus in equine periocular and penile squamous cell carcinoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.26, n1, p.131-5. 2014.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal Biology**, v. 81, n.4, p.1133-1143, 2021.

O'DONOVAN, N.; CROWN, J.; STUNELL, L.; HILL, A.D.K.; MCDERMOTT, E.; O'HIGGINS, N.; DUFFY, M.J. Caspase 3 in breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n.2, p.738- 42. 2003.

OKEGAWA, T.; LI, Y.; PONG, R.C.; HSIEH, J.T. Cell Adhesion Proteins As Tumor Suppressors. **The Journal of Urology**, v.167, n.4, p.1836-1843, 2002.

OKEGAWA, T.; PONG, R.C.; LI, Y.; HSIEH, J.T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochimica Polonica**, v.51, n.2, p.445-57, 2004.

OPORTO, C. I. S.; YAMADA, D.I.; SILVA, G.L.G.; MANZAN, I.B.; RAMALHO, L.N.; ANDRADE JUNIOR, R.L.P. Penectomia parcial em equino com carcinoma espinocelular: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 16, n. 3, p. 60-68, 2018.

ONDER, T. T.; GUPTA, P.B.; MANI, S. A.; YANG, J.; LANDER, E. S.; WEINBERG, R. A. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Research**, n.15, v.68, p.3645–3654, 2008.

PEREZ, G. I.; ACTON, B. M.; JURISICOVA, A.; PERKINS, G. A.; WHITE, A.; BROWN, J.; TRBOVICH, A. M.; KIM, M. R.; FISSORE, R.; XU, J., AHMADY, A.; D'ESTAING, S. G.; LI, H.; YOKOYAMA, S.; OKADA, H.; MAK, T. W.; ELLISMAN, M. H.; CASPER, R. F.; TILLY, J. L. Genetic variance modifies apoptosis susceptibility in mature oocytes via alterations in DNA repair capacity and mitochondrial ultrastructure. **Cell Death Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 524-533, 2007.

PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T.K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.448, p.1-10.

PORCELLATO, I., MECOCCI, S.; MECHELLI, L.; CAPELLI, K.; BRACHELENTE, C.; PEPE, M.; ORLANDI, M.; GIALETTI, R.; PASSERI, B.; FERRARI, A.; MODESTO, P.; GHELARDI, A.; RAZZUOLI, E.. Equine Penile Squamous Cell Carcinomas as a Model for Human Disease: A Preliminary Investigation on Tumor Immune Microenvironment. **Cells**, v.27, n.9, p.2364, 2020.

PORTER, A., JÄNICKE, R. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v.6, n.2, p.99–104, 1999.

RABBERS, A.S.; RABELO, R.E.; VULCANI, V.A.S; SANT'ANA, F.J.F; LIMA, C.R.O.; SILVA, L.A.F. Diagnóstico clínico, laboratorial e tratamento cirúrgico do carcinoma de células escamosas no genital de equinos machos: relatos de dois casos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n.1, p. 12-18, 2014.

RAMOS, A.T.; NORTE, D.M.; ELIAS, F.; FERNANDES, C.G. Carcinoma de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos: estudo de 50 casos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n.1, p. 5-13, 2007.

RAMSAUER, A.S.; WACHOSKI-DARK, G.L.; FRAEFEL, C.; TOBLER, K.; BRANDT, S.; KNIGHT, C.G.; FAVROT, C.; GREEST, P. Paving the way for more precise diagnosis of EcPV2-associated equine penile lesions. **BMC Veterinary Research**, v.15, n.356, p.1-13, 2019.

RIGUEIRO, I. D.; GRECCO, B. A.; NOVAES, P. E. R.S. Radioterapia no tratamento de metástases ósseas do câncer de mama. **Revista Higei@-Revista Científica de Saúde**, v.2, n.3, p.1-7, 2018.

RIZK, A.; MOSBAH, E.; KARROUF, G.; ALSOUD, M.A. Surgical Management of Penile and Preputial Neoplasms in Equine with Special Reference to Partial Phallectomy. **Journal of Veterinary Medicine**, v.2013, n.1, p.1-8, 2013.

RODRIGUES, J.C.F.; SEABRA, S.H.; SOUZA, W. Apoptosis-like death in parasitic protozoa. **Journal of Morphological Sciences**, v.23, n.1, p. 87-98, 2006.

RODRIGUES, M. M. **Avaliação da expressão de caderinas em linhagem humana de adenocarcinoma colorretal após tratamento com inibidor do peptídeo liberador de gastrina, RC-3095**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Biociência, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

ROY, F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.14, n.2, p.121-134, 2014.

ROY, F.; Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, n.23, p.3756–3788, 2008.

SANTANA, C.H. et al. Relationship between the inflammatory infiltrate and the degree of differentiation of the canine cutaneous squamous cell carcinoma. **Veterinary and Animal Science**, v.1, p.4–8, 2016.

SHABBIR, M.; KAYES, O.; MINHAS, S. Challenges and controversies in the management of penile cancer. **Nature Reviews Urology**, v.11, n.1, p.702–711, 2014.

SILVA, S.C.G; ALVES, A.D.F.; RÖNNAU, M.; TORRES, M.B.A.M. Carcinoma de células escamosas em equino com metástase pulmonar: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, n.4, p.689-698, 2015.

SILVA, T.R.O.; GONÇALVES, P.N.C.; MARCUS, V.B.; MUCCELLINI, C.I.; SANTOS, I.R.; KOMMERS, G.; FLORES, E.F.; CARGNELUTTI, J.F.; FLORES, M.M. Detection of *Equus caballus* papillomavirus-2 in equine penile/preputial papillomas and squamous cell carcinomas in southern Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.53, n.1, p.1707–1713, 2022.

SINGHAI, R.; PATIL, V.W.; JAISWAL, S.R., PATIL, S.D.; TAYADE, M.B., PATIL, A.V. E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. **North American Journal of Medicine and Science**, v.3, n.5, p.227-33, 2011.

SINGH, V.; KHURANA, A.; NAVIK, U.; ALLAWADHI, P.; BHARANI, K.K.; WEISKIRCHEN, R. Apoptosis and Pharmacological Therapies for Targeting Thereof for Cancer Therapeutics. **Sci**, v.4, n.2, p.2-25, 2022.

SOUZA, W. F. **Perda de adesão célula-célula mediada pela E-caderina em câncer colo-retal: vias de sinalização envolvidas**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia). Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro.

SUBASHINI, V. Mitotic figures evaluation in oral squamous cell carcinoma using crystal violet and feulgen stains - A comparative study. **International Journal of Orofacial Biology**, v.3, n.2, p.42-44, 2019.

TAYLOR, S.; HALDORSON, G. A review of equine mucocutaneous squamous cell carcinoma. **Equine Veterinary Education**, v.25, n.7, p.374-378, 2013.

THOMAS, A.; NECCHI, A.; MUNEER, A.; TOBIAS-MACHADO, M.; TRAN, A.T.H.; ROMPUY, A.V.; SPIESS, P.E.; ALBERSEN, M. Penile cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v.7, n.11, p.1-24, 2021.

VALENTINE, B.A. Survey of Equine Cutaneous Neoplasia in the Pacific Northwest. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, n.1, p.123-126, 2006.

VAN DEN TOP, J.G.; DE HEER N.; KLEIN, W.R., ENSINK, J.M. 2008a, Penile and preputial tumours in the horse: a retrospective study of 114 affected horses. **Equine Veterinary Journal**, n.40, v.6, p528–532, 2008.

VAN DEN TOP, J.G.; DE HEER N.; KLEIN, W.R., ENSINK, J.M. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse: a retrospective study of treatment of 77 affected horses. **Equine Veterinary Journal**, v.40, n.6, p.533-537, 2008b.

VICKERS, C.J.; GONZÁLEZ-PAEZ, G.; WOLAN, D. Selective Detection and Inhibition of Active Caspase-3 in Cells with Optimized Peptides. **Journal of the American Chemical Society**, v.135, n.34, p.12869–12876, 2013.

VIEIRA, C.B.; FEITOZA, L.; PINHO, J.; TEIXEIRA-JÚNIOR, A.; LAGES, J.; CALIXTO, J.; COELHO, R.; NOGUEIRA, L.; CUNHA, I.; SOARES, F. SILVA, G.E.B. Profile of patients with penile cancer in the region with the highest worldwide incidence. **Scientific Reports**, v.10, n.2965, p.1-7, 2020.

WEISS, E. & FRESE, K. International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals: Tumours of the skin. **Animals Bulletin of the World Health Organization**, v.50, n.1, p.79-100, 1974

WINTER, R. N.; KRAMES, A.; BORKOWSKI, A. KYPRIANOU, N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. **Cancer Research**, v.61, n.3, p. 1227-1232, 2001.

WONG, S.H.M; Chee Mun FANG, C.M.; CHUAH, L.; LEONG, C.O.; NGAI, S.C. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.121, n.1, p.11-22, 2018.

XIA, F; LEE, C.W.; ALTIERI, D.C. Tumor Cell Dependence on Ran-GTP–Directed Mitosis. **Cell, tumor, and stem cell biology**, v.68, n.6, 1826-1833.

YADAV, P.; YADAV, F.; JAINS, S.; VAIDYA, A. Caspase-3: A primary target for natural and synthetic compounds for cancer therapy. **Chemical Biology & Drug Design**, v.98, n.1, p.144-165, 2021.

YANG, X.; ZHONG, D.; QIN, H.; WU, P. WEI, K.; CHEN, G.; HE, R.; ZHONG, J. Caspase-3 over-expression is associated with poor overall survival and clinicopathological parameters in breast cancer: a meta-analysis of 3091 cases. **Oncotarget**, v.9, n.1, p.8629-8641, 2018.

ZHU, K.W.; AFFOLTER, V.K.; GAYNOR, A.M.; CRUZ, F. N.D. & PESAVENTO, P. A. Equine Genital Squamous Cell Carcinoma: *In Situ* Hybridization Identifies a Distinct Subset Containing Equus caballus Papillomavirus 2. **Veterinary Pathology**, v.52, n.6, p.1067–1072, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fotomicrografias dos carcinomas espinocelulares penianos avaliados

(A) Pérola de queratina em CEC bem diferenciado (HE. Aumento 400X). (B) CEC moderadamente diferenciado (HE. Aumento de 400X). (C) Imunomarcção positiva fraca de E-caderina em CEC moderadamente diferenciado (aumento de 400X). (D) Imunomarcção positiva de E-caderina em CEC moderadamente diferenciado (aumento DE 400x). (E) Imunomarcção positiva de Caspase-3 em CEC bem diferenciado (aumento de 400X). (F) Imunomarcção positiva de Caspase-3 próxima a pérola de queratina (aumento de 400X).

