

# RESSALVA

Alertamos para ausência das Páginas pré-textuais, não incluídas pelo autor no arquivo original.

Lopes, Rodrigo Antonio. Imunoexpressão dos marcadores de apoptose em tumores de anexos oculares de cães / Botucatu : [s.n.], 2012  
Tese

Lopes, R.A. Imunoexpressão dos marcadores de apoptose em tumores epiteliais de anexos oculares de cães. Botucatu, 2012. 72p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O presente trabalho tem por objetivos identificar a expressão dos genes supressores de tumor *TP53* e *p63*, dos genes *Bax* e *PUMA* e dos marcadores da apoptose *Caspase-2*, *Caspase-3*, *Bcl-2* e *Anexina-V* em tumores de anexos oculares espontâneos em cães. Foram utilizadas 20 casos de tumores dos anexos oculares no período de 1998 a 2009 de dois arquivos dos Serviços de Patologia Veterinária da UNESP campus de Araçatuba, e UNESP campus de Jaboticabal. Os cortes foram obtidos a partir dos blocos de parafina e submetidos à análise anatomopatológica e imunoistoquímica. Do total de 20 amostras foram diagnosticados 13 casos de carcinoma de células escamosas, 3 casos de carcinoma sebáceo, 2 caso de carcinoma basocelular e 2 casos de adenoma sebáceo. Todos as amostras apresentaram imunomarcagem para as proteínas *TP53* e *p63*, *caspase 2*, *Bcl2*, e *Bax*. Nas amostras com diagnóstico de neoplasia maligna com melhor diferenciação a imunomarcagem é mais acentuada para estes marcadores os marcadores.

Palavras –chave: *TP53*, apoptose, neoplasia e cão.

Lopes, RA Immunoexpression of apoptosis markers in epithelial tumors of ocular adnexa of dogs. Botucatu, 2012. 72p. Thesis (Ph.D.) - Veterinary Medicine College, Campus of Botucatu, Sao Paulo State University.

#### ABSTRACT

This aim of this study is to identify the expression of the tumor suppressor genes TP53 and p63, genes Bax and PUMA and apoptosis markers Caspase-2, Caspase-3, Bcl-2 and Annexin-V in spontaneous tumors in ocular adnexa dogs. 20 cases of tumors of the ocular adnexa in the period 1998 to 2009 were used of two files of the Veterinary Pathology of UNESP campus Araçatuba and UNESP campus Jaboticabal. The sections were obtained from the paraffin embedded and subjected to histopathological analysis and immunohistochemistry. From those 20 samples, were diagnosed 13 cases of squamous cell carcinoma, 3 cases of sebaceous carcinoma, 2 cases of basal cell carcinoma and 2 cases of sebaceous adenoma. All samples showed immunostaining for proteins P53 and P63, caspase 2, Bcl2, and Bax. In samples with a diagnosis of malignancy with better differentiation is more pronounced immunostaining for these markers markers.

Keywords: *TP53*, apoptosis, cancer and dog.

## 1. INTRODUÇÃO

As neoplasias, quaisquer que sejam, decorrem de alterações bioquímicas, genéticas anatômicas de células e tecidos normais. Estas células sofrem modificações tornando-se diferenciadas das normais, inclusive nas suas propriedades; crescem autonomamente, sem ou com pouca relação com os mecanismos reguladores intra e intercelulares observados nos tecidos normais. Tais alterações podem ser geradas por agentes extrínsecos e intrínsecos, ou ainda pela combinação desses. Em cães e gatos, os fatores mais comuns são a radiação ultravioleta (UV), podendo nos casos de carcinoma epidermóide, haver maior atividade de enzimas do processo de apoptose (caspases), e ainda, forte expressão de P53, sugerindo a sua mutação (MONTIANI-FERREIRA, 2008). Agentes virais tumorais (vírus da leucemia felina – FeLV, vírus do sarcoma felino), e agentes químicos carcinogênicos (petróleo, poliésteres e xileno, solventes de inseticidas tópicos presentes em xampus antipulgas e carrapatos) (BRANDES, 2009). Citam-se ainda, efeitos hormonais (fatores de crescimento; esteróides) associados á uma maior sensibilidade das células tumorais e, ainda, uma alta positividade entre eles e a expressão de P53 e Bax (DOLKA, 2011). A predisposição genética observada em que cães da raça Boxer; os quais tendem a apresentar uma maior incidência de neoplasias quando comparados às outras raças caninas (MORRISON, 1998; ROZA, 2010). Considerando tumores oculares, pode-se citar como fatores predisponentes a idade (KREHBIEL, 1975; ROBERTS, 1986), genética (MORRISON, 1998; ROZA, 2010), infecção por vírus (MORRISON, 1979; BONNEY, 1980; WILLIAMS, 1981; BRANDES, 2009),

exposição frequente a raios solares (MORGAN, 1969; BISTNER, 1998; MONTIANI-FERREIRA, 2008); a presença de condições inflamatórias crônicas (DREYFUS, 2011) e o comportamento metastático dos diferentes tipos de neoplasia (MORGAN, 1969).

Os tumores que acometem as pálpebras e a terceira pálpebra de cães apresentam maior incidência em animais idosos (9-10 anos), algumas raças são mais predisponentes (Beagles, Husky Siberiano e Setters), e são tipicamente benignos (88% dos casos), sendo descritos adenoma sebáceo, papilomas. Tumores malignos, incluindo adenocarcinoma, melanoma, carcinoma de células basais e de células escamosas, são infreqüentes, e representam uma porcentagem em torno de 8,2% dos tumores (ROBERTS, 1986; AQUINO, 2007). Nestes casos, são comparativamente maiores em tamanho, mas com pequeno potencial metastático (HIRAI et al., 1997; KREHBIEL, 1975).

A aparência e os sinais clínicos da neoplasia variam consideravelmente de acordo com a região acometida, podendo mimetizar um processo inflamatório ocular na fase inicial até um quadro de uveíte e/ou glaucoma (WILLIS, 2001). Os animais são trazidos pelos seus proprietários por apresentarem inúmeros sinais clínicos oculares como presença de formações pedunculadas (BISTNER, 1998; BONNEY, 1980), feridas crônicas, hifema “olho vermelho”, buftalmia, epífora, secreção abundante, entre outros (BISTNER, 1998).

No homem, a incidência de carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas são de 62,2% e 8,7%, respectivamente. A faixa etária de ocorrência encontra-se entre 62 e 80 anos (NARIKAWA, 2011). Pacientes com tumores periorbitais apresentam maior recorrência comparado com os extra-orbitais, nos caso de carcinoma sebáceo (EROVIC, 2012). Alguns estudos

evidenciam ainda, que esta incidência teve um aumento significativo nos últimos anos, aumentando os valores de 1,5 por milhão para 5,1 por milhão de pessoas (WANG, et al., 2003; LIN et al., 2006).

O diagnóstico não pode ser baseado somente em achados clínicos ou radiográficos. São necessários exames complementares citológicos para se estabelecer o diagnóstico definitivo. No caso de tumores oculares, os exames comumente realizados são: aspirado por agulha fina, biópsia incisional ou excisional, que permitem a realização de exames histopatológicos ou imunoistoquímicos. Em princípio, todos os tumores devem ser submetidos a exames histológicos, pois mesmo os nódulos pequenos, com aparência benigna podem revelar focos de células malignas (WILLIS, 2001).

Os métodos de tratamento mais comumente empregados para neoplasias palpebrais, tanto em seres humanos como em cães, ainda estão restritos a remoção cirúrgica do crescimento tumoral, crioterapia (DREYFUS et al., 2011) e excisão a laser. As radiações ionizantes também podem ser utilizadas, mas se limitam a alguns tipos tumorais e localizações, e ainda, podem induzir mielosupressão em cães (CLERMONT, 2012). O uso do Estrôncio-90 foi relatado por ANDRADE et al. (2003) como tratamento de carcinomas de terceira pálpebra. No estudo, os autores concluíram que tal procedimento é uma alternativa viável para a preservação desta estrutura ocular, com vantagens do baixo custo quando comparado com as outras opções de tratamento, sendo passível de ser realizado na rotina de hospitais e clínicas veterinárias, assim como, WARE e GIEGER (2011) também obtiveram resultados muito satisfatórios com o este tipo de terapia num caso de plasmocitoma em cão.

O modo de crescimento de uma neoplasia é frequentemente o indicador da sua invasividade relativa. Lesões expansivas, bem circunscritas, são mais facilmente excisadas; tumores infiltrativos com ou sem ulceração são mais agressivos, apresentando alta taxa de recidiva pós-operatória (ROBBINS e COTRAN, 2010). Tradicionalmente, cerca de 50% dos cães com tumores malignos comprovados por biópsia, sofrem recidivas ou metástases após a excisão cirúrgica. Tal procedimento é recomendado para a maioria dos cães que apresentam este tipo de neoplasia, e o objetivo terapêutico é remover toda a evidência macroscópica de tumor (DUBIELZIG, 1990). A excisão não deve ser realizada em animais que possuam carcinomas inflamatórios ou moléstias metastáticas. A alta taxa de recidiva indica a incapacidade de remoção de todos os focos de células malignas. A avaliação completa, incluindo as radiografias torácicas, a palpação cuidadosa dos linfonodos periféricos, tecido mole adjacente e estruturas ósseas, assim como análises laboratoriais adequadas, são pré-requisitos para o tratamento cirúrgico adequado (KIRK, 2003).

O prognóstico destas enfermidades baseia-se no tempo de evolução dos tumores e na rapidez com que estes são diagnosticados. As características clínicas e o comportamento biológico são os parâmetros mais importantes a serem considerados para se instituir o prognóstico (VON KROSIGK et al., 2012). Características como modo e taxa de crescimento, volume total do tumor e envolvimento dos linfonodos regionais ou distantes são fundamentais para determinar prognóstico e possível tratamento. Os tumores malignos quase sempre têm um crescimento rápido (ROBERTS, 1986).

É de fundamental importância, também, a análise dos linfonodos regionais, pois, tumores com alto potencial metastático tem prognóstico desfavorável. O

carcinoma infiltrativo está associado a um índice de recidiva significativamente mais elevado que o carcinoma não invasivo (AQUINO, 2007).

Apesar de uma profunda investigação clínico-patológica ser a base para o manejo inicial das neoplasias, pouco se conhece sobre os prognósticos e as causas dos tumores em cães. Estratégias clínicas e patológicas estão sujeitas a inúmeros erros, e métodos de visualização por imagem não são sensíveis o suficiente para uma avaliação concreta (POPOV et al., 1997).

Usualmente, um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento do câncer, de modo que uma simples alteração celular raramente é suficiente para deflagrar o processo tumoral. Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção da neoplasia (FARIA e RABENHORST, 2005).

Alterações genéticas não-letais são consideradas o alvo principal da carcinogênese. Tal dano genético (ou mutação) pode ser adquirido pela ação de agentes ambientais, tais como produtos químicos, radiação, vírus, ou pode ser herdada na linha gênica.

Os genes reguladores normais do ciclo celular são classificados em quatro classes para a promoção do crescimento das células. Os proto-oncogenes, os inibidores do crescimento celular (genes supressores de tumores), os genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e os genes envolvidos no reparo do DNA, que são os principais alvos da genética. Os alelos mutantes dos proto-oncogenes são considerados dominantes, pois eles podem transformar as células mesmo na presença de um homólogo normal. Em contraste, ambos os alelos dos

genes supressores de tumor deve estar danificados para que a transformação ocorra. No entanto, há algumas exceções a esta regra, às vezes, a perda ou a mudança de um único alelo de um gene supressor de tumor pode reduzir os níveis da atividade desta proteína, causando uma diminuição da proliferação celular. A perda de função do gene causada por danos a um único alelo é chamado haploinsuficiência. Esse achado indica que a dosagem do gene é muito importante, e que duas cópias são necessárias para um funcionamento normal. Os genes que regulam a apoptose pode se comportar como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor. As mutações dos genes de reparo de DNA não transformam diretamente as células, por afetar as suas proliferações ou a apoptose. Em contradição, estes genes afetam indiretamente a proliferação celular ou sua sobrevivência, por influenciar a capacidade do organismo para reparar os danos não-letal em outros genes, incluindo proto-oncogenes e genes supressores de tumor, e ainda, os genes que regulam a apoptose. A deficiência dos genes de reparo do DNA pode predispor as células a quadros de mutação difundidos no genoma e, portanto, para a transformação neoplásica. As células com mutações em genes de reparo do DNA desenvolvem um fenótipo mutante.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Gene supressor *TP53* e *p63***

Acredita-se que mutações do gene *TP53* e de sua família de genes são as alterações genéticas mais comuns em neoplasias em cães, entretanto pouco se sabe ainda sobre o mesmo e suas mutações (FARIA, 2005; STOCKMANN, 2011).

Considerando a grande complexidade biológica do câncer em humanos, estudos têm focado o seu alvo nos animais de companhia devido a sua semelhança nos aspectos fisiopatológicos e comportamentais na biologia do câncer. Estes animais possuem várias características tumorais desejadas, as quais preenchem uma grande lacuna entre estudos *in vivo* e *in vitro*, e estas são de extrema importância no entendimento da complexidade molecular de tumores em humanos (PINHO, 2012).

Inúmeros estudos têm tido como foco de investigação a significância do papel da família do gene *TP53* e a sua patogênese numa grande variedade de neoplasias que acometem o homem e os cães. Entretanto, os estudos revelam que o mesmo está expresso em pouco mais de 50% dos tumores (JOHNSON, 1998; CARVALHO, 2005; MONTIANI-FERREIRA, 2008; ROBBINS e COTRAN, 2010). A capacidade da proteína p53 em controlar a apoptose em resposta à lesão do DNA apresenta importantes implicações terapêuticas práticas e prognóstico (KIRPENSTEIJN, 2008). Com base nesses dados, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento tem sido investigadas, visando aumentar a atividade da proteína p53 em regular a proliferação de células tumorais, ou induzi-las à apoptose, eliminando de forma seletiva as células tumorais com função anormal do *TP53* (ROBBINS e COTRAN, 2010). Neste sentido, SHIMADA et al. (2006), ao investigarem a viabilidade, levando em consideração segurança, atividade biológica e a eficácia do tratamento utilizando terapia gênica adenoviral com gene *TP53* (Ad5CMV-p53- ADVEXIN®) em pacientes humanos com carcinoma de células escamosas esofágico, observaram redução na taxa de crescimento tumoral, segurança e viabilidade do seu uso. TOLCHER et al. (2006) demonstraram também viabilidade e segurança ao analisar a farmacocinética

deste medicamento. FUJIWARA et al. (2006) obtiveram os mesmos benefícios clínicos em pacientes com tumores de pulmão. Recentemente, LOPES et al. (2010) verificaram uma elevada presença e expressão do gene supressor de tumor *TP53* e do oncogene *c-Myc* em tumores de anexos oculares de cães. Na maioria dos casos as mutações de inativação afetam ambos os alelos do *TP53* e são adquiridas no processo de divisão das células somáticas, porém a frequência destes eventos é baixa. Alguns casos de herdabilidade de um alelo mutante também são observados (JIANG, et al., 1999). O fato das mutações serem comuns em diversos tipos de tumores sugere que a proteína p53 (proteína nuclear) funciona como uma guardiã crítica contra qualquer formação do câncer. Acredita-se que a mesma esteja relacionada com a manutenção da integridade do DNA e tem suma importância no mecanismo de reparação celular. É evidente que o *TP53* age como um “policia molecular” que impede a propagação de células geneticamente lesadas e induz a apoptose em células com danos irreparáveis ao DNA (JIANG, et al., 1999; MUTO et al., 2000; ROBBINS e COTRAN, 2010). Tumores que apresentam funcionalidade anormal do *TP53* são, em geral, mais resistentes à apoptose, e acumulam mutações adicionais que contribuem para a progressão da neoplasia (LEVINE, 2000).

Acredita-se que mutações do gene *TP53* sejam a alteração genética mais comum em tumores mamários em cadelas (VAN LEEUWEN et al., 1996), assim como outros tipos tumorais que acometem o homem e os cães (VELDHOEN e MILNER, 1998; LEE, et al., 2002; LEE et al., 2004; ZUCCARI, et al., 2004; KELLER, et al., 2007; MINTIANI-FERREIRA, 2008; STOCKMANN, 2011; PINHO, 2012).

Algumas anormalidades deste gene têm sido documentadas em carcinomas de tireóide (DEVILEE et al., 1994; TUOHY, 2012), papilomas orais (MAYR et al., 1994; TEIFKE, 1998), osteossarcomas (VAN LEEUWEN et al., 1997, KIRPENSTEIJN, 1998), adenoma da glândula perianal (MAYR et al., 1997) e linfomas (VELDHOEN et al., 1998). A super-expressão da proteína p53 também foi observada em tumores epiteliais, mesenquimais e de células redondas (VELDHOEN & MILNER, 1998). Muto et al. (2000) detectaram algumas alterações nos éxons 5-8 em tumores mamários de cães, desde os tumores benignos até os carcinomas.

CARVALHO et al. (2005), ao analisarem a presença da proteína p53 em carcinomas oculares de bovinos, concluíram que existe uma alta correlação entre a mutação gênica do gene *TP53* com inúmeros tumores sólidos, e que, a super-expressão e o acúmulo desta proteína nestes tipos tumorais sugerem uma possível mutação neste tipo de neoplasia. Salientaram ainda, que estudos moleculares mais específicos sejam realizados a fim de se promover um maior esclarecimento da relação do acúmulo desta proteína com a mutação do gene *TP53*. Na atualidade, os estudos tem se voltado para a pesquisa da possibilidade de se criar alternativas para a inativação do gene *TP53* e suas alterações em alguns casos de neoplasias de cães, uma vez que o mesmo é reconhecido como de grande potencial na terapia anti-câncer (VELDHOEN & MILNER, 1998).

A descoberta de membros da família *TP53* relevou que este gene possui colaboradores, sendo um destes, o gene p63.

Na verdade, *TP53* e p63 são agentes em uma rede complexa e com uma similaridade significativa, o que é apenas começo a ser desvendado. O *TP53* tem uma expressão onipresente, enquanto p63 mostrar uma especificidade mais

tecidual. Por exemplo, p63 é essencial para a diferenciação de estratificação do epitélio escamoso, e é encontrado com maior frequência em células basais, protegendo as células da apoptose e coordenando a sua diferenciação. Além disso, o p63 é também encontrado junto com o *TP53*, porém expressando diferentes isoformas, algumas das quais atuam como ativadores transcricionais. Estas isoformas têm a capacidade para ativar p53 e induzir a apoptose e bloquear o ciclo celular. No entanto, as outras três isoformas agem como dominantes negativos e suprimem a atividade de ambos *TP53* e da isoforma TAp63. Apesar homologia estrutural, não há nenhuma evidência de que P63 é um gene supressor de tumor, como *TP53*. O p63 também pode desempenhar um papel na replicação celular, por competição com *TP53* para ligar o DNA ou através de uma interação direta com p53 ligado ao DNA (STOCKMANN, 2011). Um exemplo ilustrativo das ações coordenadas destes genes é visto no tecido subconjuntival, em células basais do tecido mamário, que têm uma pobre prognóstico. Estes tumores têm demonstrado uma mutação em *TP53* e *p63*, o que adicionalmente, contribui para a quimiorresistência e pobre prognóstico (ROBBINS e COTRAN, 2010).

## **2.2 Apoptose**

O processo de apoptose é um processo fisiológico ativo de morte celular, que é induzida por um processo que envolve a condensação da cromatina, redução do volume celular e a formação de vesículas na membrana, denominadas corpos apoptóticos. Através da ativação de enzimas, o DNA nuclear é degradado, assim como as proteínas citoplasmáticas (SCHWARTZMAN e CIDLOWSKI, 1993; PUSTISEK, 2011). A membrana celular permanece intacta, a célula apoptótica é eliminada rapidamente antes que seu conteúdo possa extravasar e, desta forma, este tipo de morte celular não desencadeia um processo inflamatório.

A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de modos distintos. O primeiro denominado intrínseco é dependente da mitocôndria, sendo ele iniciado por sinais intracelulares pro-apoptóticos levando a liberação do citocromo e a ativação das caspases. Já no segundo processo, denominado extrínseco, ocorre a ligação receptor-ligante também culminando na ativação das caspases. Alguns estímulos, tais como as células citotóxicas, ativam diretamente a execução das caspases, outros agem através de proteínas adaptadoras e caspases iniciadoras ou através de eventos mitocondriais (GRIVICICH, 2007).

### **2.3 Via intrínseca:**

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos

convergem principalmente para a mitocôndria. Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e consequente liberação de suas moléculas pró-apoptóticas. O controle e a regulação da apoptose são influenciados pelos membros da família da proteína Bcl-2, que pode inibir ou estimular a morte celular (Figura 1). O protooncogene Bcl-2 e a sua expressão têm como função proteger as células da morte prevenindo ou impedindo o processo apoptótico. Esta proteína está localizada na membrana externa da mitocôndria e é essencial na regulação da liberação do citocromo *c* (YANG ET AL., 1997). Quando este citocromo *c* é liberado para o citosol, ocorre a ativação da apoptose por meio da ativação das caspases.

A proteína codificada pelo gene Bax é da família do Bcl-2 e apresenta-se como um agente ativo que interage com a membrana mitocondrial, aumentando a abertura dos seus canais para o citosol. Esta leva à perda do potencial da membrana e consequente liberação de citocromo C para fora da mitocôndria. A sua expressão é regulada pelo gene supressor de tumor *TP53* e foi demonstrado que este processo está diretamente envolvido no processo da apoptose (GRIVICICH, 2007).

Outro agente participante do grupo do *TP53* no processo de apoptose é o PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), que foi inicialmente identificado como um gene ativado pelo *TP53*, e como uma proteína homóloga ao Bcl-2. PUMA é extremamente efetivo na indução da apoptose (JIAN YU, 2003).

As células apoptóticas expressam novos ligantes nas camadas mais externas pela perda da simetria de suas membranas plasmáticas (Fosfatidilserina)

para que sejam capturados pelas células fagocitárias. Estes fosfolípidios se transportam para o meio exterior através da membrana plasmática e, por este meio, podem ser identificadas, pois se ligam a corantes específicos, como a Anexina-V. Esta molécula pertence a uma classe de proteínas dependentes de  $Ca^{2+}$  mostrando estar envolvida na exocitose, inibição da proteína quinase c e na atividade dos canais de cálcio (HAYES et al., 2004; ROBBINS e COTRAN, 2010).

#### **2.4 Via extrínseca**

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF). Este processo é capaz de ativar a cascata das caspases. Todos os membros da família rTNF possuem um subdomínio extracelular rico em cisteína, o qual permite que eles reconheçam seus ligantes. Tal fato resulta na trimerização e consequente ativação dos receptores. A sinalização a seguir é mediada pela porção citoplasmática desses receptores que contém uma seqüência de 65 aminoácidos chamada "domínio de morte" sendo, por isso, chamados de "receptores de morte celular". Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (GRIVICICH, 2007).

As caspases são proteases cisteínas sintetizadas como precursores inativos e podem ser caracterizadas como iniciadoras ou efetoras da cascata das caspases (TORNBERRY e LAZEBNIK, 1998). As caspases iniciadoras (caspase-



## 2.5 Conformação estrutural das células em apoptose

A perda de assimetria do fosfolípido de membrana contribui para facilitar o reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos pela exposição de outros ligantes que estão obscurecidos nas células viáveis.

Esta perda de assimetria do fosfolípido associado a apoptose é caracterizada por mudanças na fluidez relativa vista em células que mantêm uma distribuição de fosfolípido normal; alterações na fluidez contribui para mudanças na função, conformação, distribuição na membrana da proteína.

No final de 1970, a anexina V foi isolada de placenta humana, poucos anos depois esta proteína foi descoberta independentemente em vasos sanguíneos e nomeadas como proteína vascular anticoagulante- $\alpha$  (VAC- $\alpha$ ) com propriedade de inibir a coagulação sanguínea. O mecanismo anticoagulante é baseado na alta afinidade de ligação a fosfolípidos de membrana, especialmente de fosfatidilserina (BOERSMA et al., 2005; BRUMATTI, 2008; VAN GENDEREN, et al., 2008). Assim, a anexina V tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípidos de membrana plasmática, através de suas cargas negativas na presença de íons cálcio. Ao utilizar-se anexina-V marcada com FITC para detecção de apoptose é possível avaliar os níveis de fosfatidilserina expostas na membrana celular externa que se associaram a anexina-V, indicando fase inicial de apoptose (apoptose precoce).

## 2.6 Objetivos

Frente aos trabalhos realizados na Medicina descritos anteriormente e a escassez de dados sobre os estudos da expressão do gene supressor de tumor *TP53* e membros da sua família (p63), dos genes Bax e PUMA e outros marcadores da apoptose nos tumores de anexos oculares de cães, propõe-se analisar tais enfoques no cão, uma vez que não foi encontrado nada versando sobre a expressão dos marcadores da apoptose na literatura consultada. Acredita-se que o estudo abordando esse tema possa trazer contribuição significativa no que tange ao prognóstico e terapêutica do câncer de anexos oculares em cães, cuja ocorrência é relevante em nosso meio.

Torna-se ainda inédito a presença de estudos com enfoque na expressão dos genes supressores de tumor *TP53* e p63, dos genes Bax e PUMA, pelo método da imunofluorescência, e no processo de apoptose dos tumores de anexos oculares em cães.

O presente trabalho tem por objetivos identificar a expressão dos genes supressores de tumor *TP53* e p63, dos genes Bax e PUMA e outros marcadores da apoptose Caspase-2, Caspase-3, Bcl-2 e Anexina-V em tumores de anexos oculares espontâneos em cães.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

As amostras estudadas foram obtidas junto ao Serviço de Patologia Veterinária da FMVA, onde foram selecionados 12 casos de tumores dos anexos oculares no período de 1998 a 2009, destaca-se que este estudo foi uma continuidade do projeto de pesquisa realizado pelo aluno durante seu curso de mestrado. Um número de 8 amostras foram disponibilizadas pela Dra. Adriana Morales (Oftalmovet- Valinhos-SP), sendo selecionados um total de 20 casos de tumores epiteliais dos anexos oculares de cães.

De acordo com os princípios éticos na experimentação animal, o projeto foi considerado aprovado pela comissão da Universidade Estadual Paulista - FMVZ, com o numero de protocolo 71/2012-CEUA no dia 9 de abril de 2010.

Em todas as amostras, foram colhidos fragmentos para as seguintes análises: 1) anatomopatológica; 2) imunohistoquímica para os genes supressores de tumor p53 e p63; 3) imunofluorescência para os genes Bax e PUMA e para os marcadores de apoptose caspase-2, caspase-3, Bcl-2 e Anexina-V. Para tanto, dos blocos parafinados foram obtidos cortes em secções de três micrômetros (3µm) e colocados em lâminas de vidro.

#### **3.2 Avaliação Anatomopatológica dos tumores**

Os fragmentos para análise anatomopatológica foram provenientes de peças cirúrgicas que foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas e, posteriormente, incluídos em parafina. Dos blocos foram obtidos fragmentos de 3 µm, que foram corados rotineiramente pela coloração de H.E. (Hematoxilina e Eosina) e analisados por microscopia de luz. As lâminas foram avaliadas por um único patologista e, posteriormente, foram documentadas por fotos junto ao Laboratório de Patologia da FMVA-Unesp, sob supervisão da Prof<sup>a</sup>. Ass. Dr<sup>a</sup>. Maria Cecília Rui Luvizotto.

### 3.3 Imunohistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à imunomarcção para os anticorpos *TP53* e *p63* para verificação da expressão destes genes nos tumores. Inicialmente, foi realizada a desparafinização do tecido em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação dos cortes foi realizada utilizando-se concentrações decrescentes de álcool. A recuperação antigênica pelo calor foi realizada em forno microondas com solução de citrato 10 mL (pH = 6.0) (2,1 g de ácido cítrico monohidratada diluídos em 1000 mL de água destilada) em duas etapas de fervura de 5 minutos cada, deixando-se o material esfriar em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e, em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de 100 mL de peróxido de hidrogênio (20V) diluída em 100 mL de metanol, durante 30 minutos. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-p53 e anti-p63 – SIGMA ALDRICH®) na diluição de 1:200 para ambos os anticorpos, utilizando o diluente de anticorpos com redução de

marcação de fundo (DAKO®), e por 18 horas a uma temperatura de 4<sup>o</sup>C em câmara úmida; e como controle negativo, não foi adicionado o anticorpo primário sobre os tecidos. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS (pH=7,4). A incubação com o “kit” LSAB (Dako®), que contempla o anticorpo secundário, ocorreu durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram submetidas à passagem em solução tampão. A revelação foi conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB DAKO®), com sucessivas lavagens em solução tampão, água corrente e água destilada. Por fim, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (Dako®), 5,0 mL por lâmina e lavagem em água destilada. As lâminas foram desidratadas em lavagens crescentes de alcoóis e xilol e, posteriormente, montadas em resina sintética.

### **3.4 Imunofluorescência**

Os cortes histológicos foram submetidos à imunomarcação para Bax, PUMA, Caspase-2, Caspase-3, Caspase 9, Bcl-2 e Anexina-V . Inicialmente, os tecidos foram desparafinizados em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação dos cortes foi realizada, utilizando-se concentrações decrescentes de álcool. Os cortes foram fixados na lâmina com paraformaldeído 4%, por 30 minutos, e em seguida as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS (pH 7.4) 1X concentrado. Para a permeabilização das células, os cortes permaneceram imersos por 30 minutos em uma solução de PBS 1X com TRITON (SIGMA ALDRICH®) a 0,5%. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com 100 µl por corte numa solução contendo os anticorpos primários, por 18 horas a uma temperatura de 4<sup>o</sup>C em câmara úmida na diluição de 1:500; 1:1000; 1:400;

1:1000; 1:200; 1:500 e 1:4000, respectivamente, e, como controle negativo, não foi adicionado os anticorpos primários sobre os tecidos. Ato contínuo, as lâminas foram novamente lavadas em solução tampão PBS. A incubação com o “kit” LSAB (Dako®), que contempla o anticorpo secundário, ocorreu durante uma hora na temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram submetidas à nova lavagem. Novamente as lâminas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente em câmara úmida com o cromógeno fluorescente FITC e Cy3 (SIGMA ALDRICH®) na diluição de 1:500 e 1:200, respectivamente. Foram submetidas a nova lavagem, e logo após uma última incubação com os contracorantes Iodeto Dipropídeo e DAPI (SIGMA ALDRICH®), respectivamente. Após este procedimento as lâminas foram montadas em meio aquoso (SIGMA ALDRICH®), com lamínulas de vidro, e visualizadas em microscópio de fluorescência.

### **3.5 Avaliação Microscópica**

As lâminas correspondentes ao procedimento de imunohistoquímica foram analisadas em microscopia de luz e em seguida fotodocumentadas. Já as lâminas correspondentes ao procedimento de fluorescência foram visualizadas utilizando microscópio de fluorescência, usando os filtros FITC, Cy3 e DAPI para a visualização das possíveis marcações e posterior fotodocumentação das imagens. Foi utilizado o microscópio Axio A3, Carl Zeiss junto ao Laboratório de Virologia da FMVA – Unesp, sob auxílio da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tereza Cristina Cardoso da Silva. Os dados foram analisados por 3 avaliadores separadamente para não haver influência na análise. Na imunohistoquímica foi feita uma avaliação com relação ao número de células marcadas por campo no microscópio, já na

imunofluorescência a intensidade não foi avaliada, foi somente classificada em positiva e negativa.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Avaliações anatomopatológicas

No total das 20 amostras, foram diagnosticados os seguintes tumores: 2 adenomas sebáceos, 2 carcinomas basocelular, 2 carcinomas sebáceos, 13 carcinomas de células escamosas (figura 2) e em uma das amostras, verificou-se o carcinoma de células escamosas e o da glândula sebácea. No quadro 01, estão apresentadas as características dos cães e do tumor nas diferentes amostras.

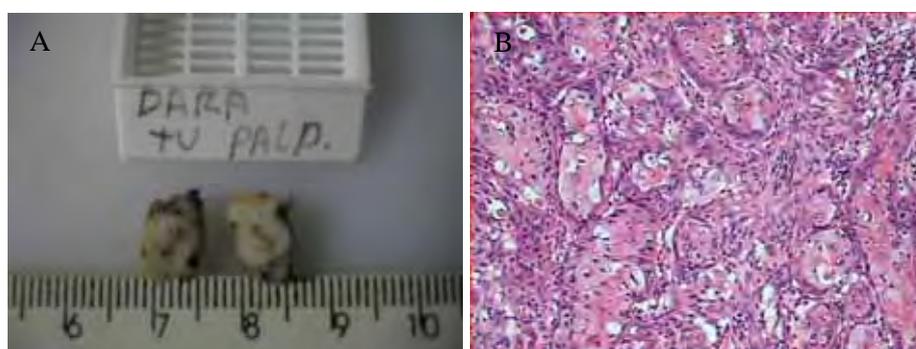


Figura 2. **A.** Aspecto macroscópico de tumor localizado na pálpebra. **B.** Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas, HE, 20x.

Quadro 1. Distribuição das diferentes amostras avaliadas, segundo idade, raça, sexo, localização, diâmetro do tumor e diagnóstico histopatológico.

<b>Amostra</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localização</b>	<b>Diâmetro</b>	<b>Diagnóstico</b>
1	5	Rottweiler	F	Pálpebra superior Esquerda	0,5 cm	Carcinoma de células escamosas
2	10	Sheepdog	F	Face interior da pálpebra Superior direita	1 cm	Carcinoma de células escamosas bem diferenciado
3	8	Beagle	M	Conjuntiva da 3ª. Pálpebra, sangrante e friável	1 cm	Carcinoma de células escamosas
4	7	SRD	F	Pele periocular esquerdo, próximo comissura interna	---	Carcinoma células escamosas pouco diferenciado
5	---	Weimaraner	F	Pálpebra superior esquerda	1 cm	Carcinoma células escamosas e car. Glândula sebácea
6	7	Doberman	F	Pálpebra inferior direita, coloração escura	2	Carcinoma de células escamosas
7	2,6	SRD	M	Protrusão gl. da 3ª. Pálpebra	---	Carcinoma de células escamosas
8	5	SRD	M	Pálpebra inferior, recidiva de cirurgia há 1 ano	2 cm	Carcinoma de células escamosas (grau III)
9	9	Poodle	M	3ª. Pálpebra e pálpebra inferior direita	2 cm	Carcinoma de células escamosas (grau III)
10	9	SRD	F	Gl. 3ª. Pálpebra direita e esquerda	3 a 4 cm	Carcinoma de células escamosas
11	6	---	F	Terceira pálpebra esquerda	---	Carcinoma de células escamosas
12	8	Boxer	F	Terceira pálpebra, nódulo firme, marrom escuro	5 cm	Carcinoma de células escamosas
13	--	SRD	M	Pálpebra	2cm	Adenoma Sebasceo
14	--	SRD	M	Bulbo ocular	---	Carcinoma de células escamosas
15	--	SRD	F	Pálpebra	3cm	Carcinoma sebasceo
16	--	SRD	F	Pálpebra	2cm	Carcinoma Basocelular
17	--	SRD	F	--	3cm	Carcinoma de células escamosas
18	--	SRD	F	Pálpebra	3cm	Adenoma sebasceo
19	--	SRD	F	Pálpebra	2,5cm	Carcinoma sebasceo
20	--	SRD	--	--	4CM	Carcinoma basocelular

Legenda: SRD: sem raça definida; F: fêmea; M: macho; cm: centímetros.

## 4.2 Avaliações Imunoistoquímicas

As lâminas coradas pelo HE foram utilizadas como controle à observação das regiões imunomarcadas para o anticorpo Anti-p53 e Anti-p63.

Na imunoistoquímica, todos os fragmentos de tecido neoplásico de caráter maligno apresentaram forte expressão da proteína p53 (figura 3), porém as amostras com diagnóstico de neoplasia benigna apresentaram uma marcação menos intensa, ou seja, com um menor número de células marcadas por campo visualizado ao microscópio óptico.

No entanto, a expressão da proteína p63 foi menos intensa em todas as amostras, não havendo diferença entre o caráter maligno e benigno dos tumores. Houve uma tendência maior deste marcador a ser mais concentrado na porção basal do epitélio.

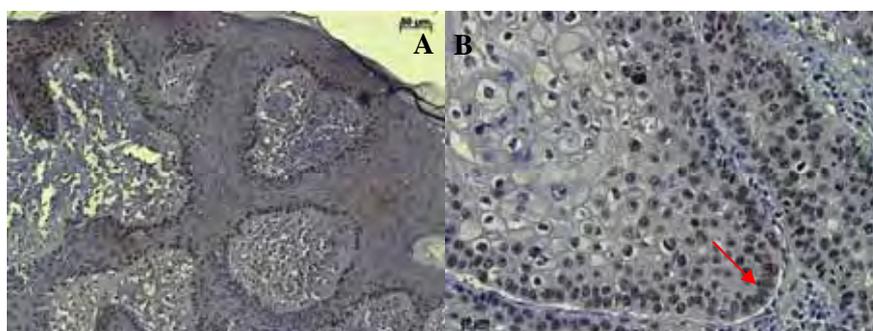


Figura 3. **A.** Fotomicrografia da imunomarcação para anticorpo Anti-p63, (20x) em carcinoma de células escamosas. **B.** Fotomicrografia imunomarcação intensa (seta vermelha) para anticorpo Anti-p53, (40x), na mesma amostra.

### 4.3 Avaliações por Imunofluorescência

No procedimento de imunofluorescência, os fragmentos de tecidos neoplásicos apresentaram a seguinte expressão: A caspase 2, Bcl-2 e Bax apresentam imunomarcção em todas as amostras (figura 4). No entanto, duas amostras não apresentaram reação para a caspase-3, 4 amostras não foram marcadas para a caspase-9, 9 amostras negativas para Anexina-V e 03 amostras foram negativas para o PUMA.

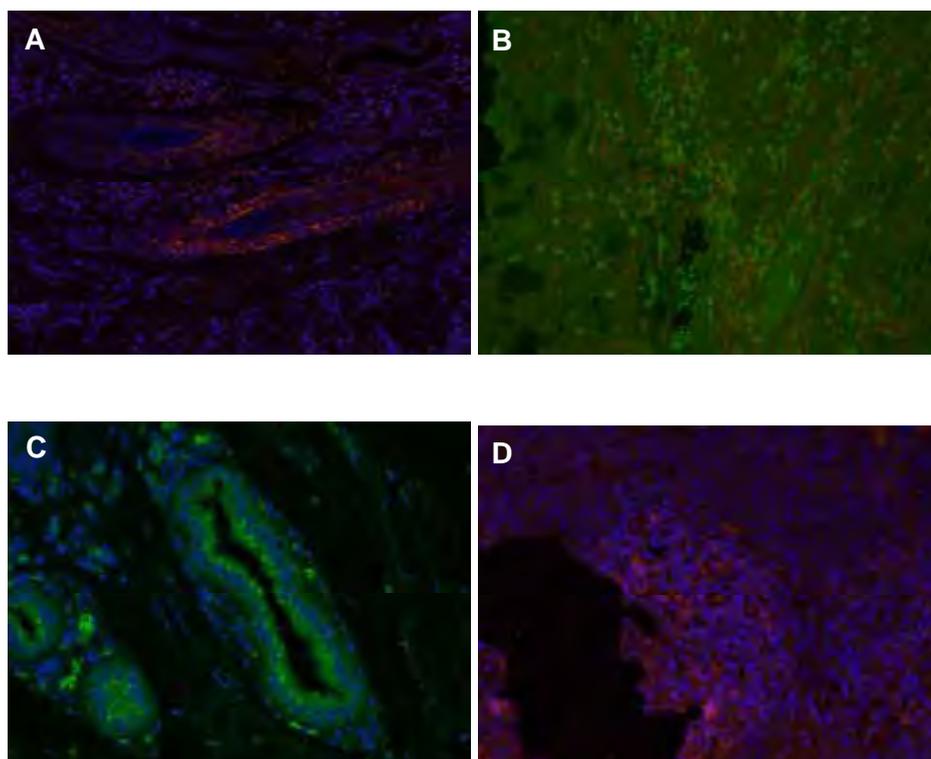


Figura 4. Fotomicrografias por fluorescência em carcinoma de células escamosas. **A.** Imunomarcção para Caspase 2, cromógeno Cy3 e DAPI, (20x); **B.** PUMA, cromógeno FITC e Iodeto Dipropídeo,(20x); **C.** Caspase 3, (40x) e **D.** Bax (20x).

No quadro 2, estão representados os resultados resumidos obtidos a partir do processo de imunofluorescência para os diferentes marcadores relacionados a apoptose.

Quadro 2. Representação gráfica das diferentes amostras avaliadas, segundo os diferentes marcadores relacionados a apoptose em tumores de anexos ocular.

<b>Amostra</b>	<b>Cas. 2</b>	<b>Cas. 3</b>	<b>Cas.9</b>	<b>Bcl-2</b>	<b>Anexina-V</b>	<b>Bax</b>	<b>PUMA</b>
1	+	+	-	+	-	+	-
2	+	+	-	+	+	+	-
3	+	-	-	+	-	+	-
4	+	-	-	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	-	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	-	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	-	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	-	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	-	+	+
20	+	+	+	+	-	+	+

Legenda: Cas.- caspase;

## 5. DISCUSSÃO

Os avanços biotecnológicos têm permitido demonstrar a presença e a expressão de genes envolvidos na carcinogênese, o que facilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares dos diversos tipos de câncer.

O diagnóstico das neoplasias oculares é frequentemente determinado por exames anatomopatológico e/ou imunoistoquímica. O mesmo fora realizado aqui empregando a imunoistoquímica como ferramenta para a detecção dos genes supressores de tumor *TP53* e p63, e foi observada intensa imunoreatividade para estes marcadores.

O procedimento de imunoistoquímica (IHC) criou um amplo campo para uma análise funcional da morfologia (analítico ou molecular), sobretudo porque tornou os métodos de imunoperoxidase aplicáveis à rotina em tecidos conservados em parafina (Shi et al. , 2001). A desvantagem da utilização de tecidos fixados em formalina é devido aos problemas oriundos de alta temperatura, quando as amostras devem ser transportados a partir de explorações até os laboratórios. Nesse, os tecidos congelados podem ser comprometidos pelas temperaturas tropicais, resultando em qualidade inferior de amostras em comparação com tecidos fixados com formalina e em parafina (TEIXEIRA et al., 2007).

A utilização de recuperação antigênica de cortes de tecidos parafinados, em soluções de pH baixo, demonstrou ser compatível com a coloração para IHC, utilizando tanto peroxidase ou coloração de fluoresceína (imunofluorescência – IFA) na amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (RAMOS VARA, 2005). Segundo a literatura consultada, IFA só fora realizada sobre outros tipos

de tecidos, e sua aplicação em tecidos fixados em formalina não havia sido descrito antes para detectar quaisquer marcador em tecidos de anexos oculares de cães a partir de amostras clínicas.

DANESHTALAB et al. (2011) concluíram que a recuperação antigênica foi mais efetiva quando associava um detergente (SDS 1%) a uma enzima para promover a digestão das células (tripsina 0,1%) do que realizar a técnica usando o calor. No entanto, nas amostras estudadas não houve diferenças nesta recuperação de antígenos entre as técnicas, ao contrário do que foi esperado, a técnica de recuperação antigênica pelo calor não promoveu a liberação dos cortes da lâmina de vidro.

A expressão das proteínas p53 e p63 nos tumores de anexos oculares em cães ainda não haviam sido descritas pela técnica de imunistoquímica. No entanto, neste trabalho, ambas as proteínas apresentaram uma alta expressão, e principalmente nas amostras que foram diagnosticadas com um maior grau de malignidade. MONTIANI-FERREIRA et al. (2008), ao analisarem um caso de carcinoma de células escamosas localizado na córnea, encontraram uma forte expressão de p53 nestas células neoplásicas, porém não realizaram a pesquisa para o p63. STOCKMANN et al. (2011) também encontraram uma alta expressão destas proteínas (92,3%) em tumores venéreo transmissível de cães e, KIRPENSTEIJN et al. (2008) observaram uma porcentagem de 40,7% em osteossarcomas. No entanto, CHANDLER et al. (2009) concluíram que a p53 pode não desenvolver um papel importante no desenvolvimento tumoral ao analisarem amostras de hemangiomas e hemangiossarcomas.

A super expressão de Bcl-2 tem sido associada com p53 mutante. A p53 pode induzir apoptose, levando a permeabilização da membrana mitocondrial

externa, e forma complexos com Bcl-2 proteínas, resultando na liberação de citocromo C a partir de mitocôndrias (STOCKMANN et al., 2001). As amostras dos carcinomas de células escamosas apresentaram uma super expressão do Bcl-2, assim como do Bax e PUMA, portanto, todos relacionados com a saída do citocromo c, dando início ao processo de apoptose. Três amostras não apresentaram marcação para o PUMA, no entanto apresentaram sinalização para o Bax, indicando desta forma uma liberação do citocromo c. Todo este processo associado ao grande achado positivo para as caspases-2, caspase-3 e caspase-9 nestas amostras, reforçando etapas do processo de morte celular por apoptose.

As duas amostras correspondes aos adenomas nesta avaliação apresentaram a expressão de todos os marcadores, exceto uma, que não apresentou marcação para o a Anexina-v, indicando que este tipo de tumor também apresente forte grau de apoptose e ativação do dos genes supressores de tumor *TP53* e p63.

Com base nestes achados, pode se concluir também que em carcinomas de células escamosas, carcinoma da glândula sebácea e em adenomas em pálpebras e terceira pálpebra de cães apresentam forte ativação dos genes supressores de tumor *TP53* e p63 e conseqüente ativação do processo de apoptose, deixando para as futuras pesquisas e para a terapias gênicas uma porta em aberto para melhores avaliações destes tipos de tratamentos, que tão logo estarão presentes em nosso meio.

## 6. CONCLUSÃO

- A realização dos métodos de imunoistoquímica e imunofluorescência em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina é factível em carcinomas de anexos oculares de cães.
- Os carcinomas de anexos de cães, especialmente os carcinomas de células escamosas, apresentam uma alta atividade da p53 e da p63, sendo que a segunda é localizada, em sua grande parte, nas células mais basais do epitélio.
- A concentração de Bax e PUMA na parede das mitocôndrias nestes tumores é aparentemente maior do que a concentração do Bcl-2, processo este explicado pela presença das caspases efetoras da via intrínseca do processo de apoptose.

A detecção de Anexina V, na maior parte dos carcinomas de células escamosas, sugere o processo inicial de morte celular por apoptose.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDRADE, A.L., et al. Clinical Trial with <sup>90</sup>Strontium low radiation for treatment of third eyelid neoplasms in dogs. On-line: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Document n°. P3028.0903.

AQUINO, S.M. Management of eyelid neoplasms in the dog and cat. *Clinic Technology Animal Practice*, v.22, n.2, p.46-54, 2007.

BISTNER, S.I. Olho e órbita. In: *Slatter: Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, 2 ed., v.2, cap 158, p.2553-65, 1998.

BRANDES, K. et AL. Detection of canine oral papillomavirus DNA in conjunctival epithelia hyperplastic lesions of three dogs. *Veterinary Pathology*. v.46, n.1, p.34-38, 2009.

BOERSMA, H. et al. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *Journal. Nucl. Med.*, v. 46, n. 12, p. 2035-2050, 2005.

BONNEY, C.H., et al. Papillomatosis of the conjunctiva and adnexa in dogs. *The Journal of American Veterinary Medical Association*, v.176, p.48-51, 1980.

BRUMATTI, G. et al. J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, v. 44, p. 235-240, 2008.

CARVALHO, T., et al. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, v.42, n.1, p.66-73, 2005.

CHANDLER, H.L. et al. Immunohistochemical analysis of ocular hemangioma and hemangiosarcomas in dogs. *Veterinary Ophthalmology*.v.12, n.2, p.83-90, 2009.

CLEMOUNT, T. et al. Radiotherapy-induced myelosuppression in dogs: 103 cases (2002-2006). *Veterinary Comparative Oncology*. v.10, n.1, p.24-32, 2012.

DANESHTALAB, N. et al. Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies. *Journal of Pharmacological Toxicology Methods*. v.61, n.2, p.127-135, 2010.

DEVILEE, P., et al. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyoid carcinoma. *Anticancer Research*, v.14, n.5A, p.2039-46, 1994.

DOLKA, I. et al. Relationship between receptors for insulin-like grown factor-I, steroid hormones and apoptosis-associated proteins in canine mammary tumors. *Polish Journal of Veterinary Science*. v.14, n.2, p.245-251, 2011.

DREYFUS, J. et al. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratits. *Veterinary Ophthalmology*. v.14, n.3, p.162-168. 2011.

DUBIELZIG, R. R. Ocular neoplasia in small animals. *Vet Clin North Am Anim Pract* v.20, n.3, p.837-48, 1990.

EROVIC, B.M. et al. Sebaceous gland carcinoma of the head and neck: The Princess Margaret Hospital experience. *Head & Neck*. 2012.  
Doi:10.1002.hed.22964.

FARIA, M.H.G., RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.52, n.2, p.165-171, 2005.

FUJIWARA, T., et al. Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.11, p.1689-1699, 2006.

GRIVICICH, I. et al. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v.53, v.3, p.335-343, 2007.

HIRAI, T., et al. Apocrine gland tumor of the eyelid in a dog. *Veterinary Pathology*, v.34, p.232-234, 1997.

JIANG, W., et al. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, v.18, p.4247-4253, 1999.

JOHNSON, A.S., COUTO, C.G., WEGWORST, M. Mutation of the P53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis*, v.19, n.1, p.213-217, 1998.

KELLER, S.M., et al. A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. *Journal of Comparative Pathology*, v.37, p.59-70, 2007.

KIRK, N.G. Doenças e cirurgia da terceira pálpebra do cão. Em: Manual de Oftalmologia Veterinária, Primeira edição brasileira, Ed. Manole, cap.6, p.120-121, 2003.

KIRPENSTEIJN, J. et al. TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery*, v.37, n.5, p.454-60, 2008.

KREHBIEL, J.D., LANGHAN, R.F. Eyelid neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.36, p.115-119, 1975.

LEE, C., et al. Mutation and overexpression of P53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

LEE, C., KWEON, O. Mutations of P53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science*, v.3, n.4, p.321-325, 2002.

LEVINE, R.A. Overexpression of the sis oncogene in a canine osteosarcoma cell line. *Veterinary Pathology*, v.39, p.411-412, 2000.

LIN, H.Y. et al. Incidence of eyelid cancers in Taiwan: a 21-year review. *Ophthalmology*, v.113, n.11, p. 2101-2107, 2006.

LOPES, R.A. et al. Occurrence and expression of p53 supressor gene And c-myc oncogene in dog eyelid tumors. *Veterinary Ophthalmology*. v.13, n.2, p.69-75, 2010.

MAYR, B., et al. Canine tumour suppressor gene p53--mutation in a case of adenoma of circumanal glands. *Veterinary Research Community*, v.21, n.5, p.369-373, 1997.

MAYR, B., et al. Sequence of an exon of the canine p53 gene--mutation in a papilloma. *Brasilian Veterinary Journal*, v.150, n.1, p.81-84, 1994.

MONTIANI-FERREIRA, F. et al. Corneal suqmous cell carcinoma in a dog: a case report. *Veterinary Ophthalmology*. v.11, n.4,,p.269-272, 2008.

MORGAN, G. Ocular tumors in animals. *Journal of Small Animals Practice*, v.10, n.10, p.563-70, 1969.

MORRISON, W.B., VONDERHAAR, M.A., RICHARDSON, R.C. Biologia da moléstia neoplásica. In: *Slatter: Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*, segunda edição, v. 2, cap.148, p.2387, 1998.

MUTO, T., et al. P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology*, v.37, p.248-253, 2000.

NARIKAWA, S. et al. Frequency of occurrence of eyelid basal cell carcinoma in the centralwest region of Sao Paulo state and carries characteristics. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. v.74, n.4, p.245-247, 2011.

PINHO, M.S.L. Proteína P53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. On-line: <http://www.sbcop.org.br/revista>. Documento nº.P258\_260.

PINHO, S.S., et al. Canine Tumors: a spontaneous animal modelo f humam. *Translation Research*, v.159, n.3, p.165-172, 2012.

POPOV, Z., et al. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *American Cancer Society*, v.80, n.8, 1472-1481, 1997.

PUSTISEK, N.; SITUM, M. UV-radiation, apoptosis and skin. *Collegium Antropologicum*. v. 35, n.2, p.339-341, 2011.

ROBERTS, S.M. et al. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *Journal of the American Veterinary Medicine Associations*. v.189, n.10, p.1355-1359, 1986.

ROBBINS,SL., COTRAN V. Neoplasias In: Patologic bases of Diseases. 8<sup>a</sup> (ed, Saunders) San Francisco –CA; v.7, p. 515 – 535, 2010.

ROBERTS, S.M., SEVERIN, G.A., LAVACH, J.D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *The Journal of American Veterinary Medical Association*, v.189, n.10, p.355-59, 1986.

ROZA, M.R., et al. Aggressive Spindle Cell Rhabdomyosarcoma in an 11-Month-Old Boxer Dog. *Journal of Veterinary Medicine Science*. v.72, n.10, p.1363-1366, 2010.

SHI, S.R. et al. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. v.49, n. 8, p.931-937, 2001.

SHIMADA, H., et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, v.97, n.6, p.554-561, 2006.

STOCKMANN, D. et al. Detection of the tumor suppressor gene TP53 and expression of TP53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumors. *Veterinary Comparative Oncology*. v.9, n.4, p.251-259, 2011.

TEIFKE, J.P. et al. Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization. *Veterinary Microbiologic*. v.60, n.4, p.119-130, 1998.

TOLCHER, A.W., et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.24, n.13, p.2052-2058, 2006.

TUOHY, J.L. et al. Outcome following simultaneous bilateral thyroid lobectomy for treatment of thyroid gland carcinoma in dogs: 15 cases (1994-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.241,n.1, p.95-103, 2012.

VAN GENDEREN, H.O. et al. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1783, p. 953–963, 2008.

VAN LEEUWEN, I.S., et al. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. *Cancer Letters*, v.111, n.1-2, p.173-178, 1997.

VAN LEEUWEN, I.S., et al. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research*, v.16, n.6B, p.3737-3744, 1996.

VELDHOEN, N., et al. Isolation of canine p53 cDna and detailed characterization of the full length canine p53 protein. *Oncogene*, v.16, p.1077-1084, 1998.

VELDHOEN, N., et al. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*, v.16, n.2, p.249-255, 1998.

VON KROSIK, F. et al. Magnetic resonance imaging and ultrasonography in dogs and cats with ocular and orbital diseases. Part 1: Ocular Diseases. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe k, Kleintiere/heimtiere*. v.40, n.1, p.7-15, 2012.

WARE, K.; GIEGER, T. Use of Strontium-90 plesiotherapy of treatment os a lingual plasmacytoma in a dog. *Journal of Small Animal Practice*. v.52, n.4, p.220-223, 2011.

WANG, J.K., et al. Malignant eyelid tumours in Taiwan. *Eye*, v.17, n.2, p.216-220, 2003.

WILLIAMS, L.W., GELATT, K.N. Ophthalmic neoplasms in the cat. *J A Anim Hosp Assoc.*, v.17, p.999-1008, 1981.

WILLIS, A.M., WILKIE, D.A. Ocular Oncology. *Clinical Techniques of Small Animal Practice*, v.16, n.1, p.77-85, 2001.

YU, J., ZHANG, L. No PUMA, no death: Implications for p53-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, v.35, p.249-249, 2003.

ZUCCARI, D.A., et al. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary Clinic Pathology*, v.33, n.1, p.23-28,2004.

**Trabalho a ser enviado a revista *Veterinary Ophthalmology*.**

**IMUNOEXPRESSION DAS PROTEÍNAS P53 E P63 EM TUMORES OCULARES  
DE CÃES**

Rodrigo Antonio Lopes<sup>1</sup>, Alexandre Lima de Andrade<sup>2</sup>, Adriana Morales<sup>3</sup>, Cláudia Valéria  
Seullner Brandão<sup>4</sup>

**Correspondência:**

Cláudia Valéria Seullner Brandão.

Tel: (55) 14 3880 2022

E-mail: [valeriasb@fmvz.unesp.br](mailto:valeriasb@fmvz.unesp.br)

---

<sup>1</sup> Aluno de pós graduação do programa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, Brasil.

<sup>2</sup> Professor Adjunto, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba-SP, Brasil.

<sup>3</sup> Aluna de Pós doutorado do programa da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV-, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal –SP, Brasil.

<sup>4</sup> Professora Adjunto, Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu-SP, Brasil.

## RESUMO

Marcadores tumorais têm sido pesquisados no intuito de obterem-se informações mais precisas sobre o prognóstico dos pacientes. A capacidade da proteína p53 em controlar a apoptose em resposta à lesão do DNA apresenta importantes implicações terapêuticas práticas. Já a proteína p63 tem papel comprovado no desenvolvimento epidérmico. Com base nesses dados, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento tem sido investigadas, visando aumentar a atividade destas proteínas em regular a proliferação de células tumorais, ou induzi-las à apoptose. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise imunohistoquímica, a presença das proteínas p53 e p63 em tumores de anexos oculares de cães. **Material e Método:** Foram selecionados 20 casos de tumores de anexo ocular (pálpebra e 3 pálpebra) de cães de dois arquivos dos Serviços de Patologia Veterinária da UNESP campus de Araçatuba, e UNESP Campus de Jaboticabal. Os cortes foram obtidos a partir dos blocos de parafina e submetidos à análise anatomopatológica e imunohistoquímica. **Resultados:** Do total de 20 amostras foram diagnosticados 13 casos de carcinoma de células escamosas, 3 casos de carcinoma sebáceo, 2 caso de carcinoma basocelular e 2 casos de adenoma sebáceo. Todas as amostras apresentaram imunomarcagem para as proteínas P53 e P63. **Conclusão:** Nas amostras com diagnóstico de neoplasia maligna com melhor diferenciação a imunomarcagem é mais acentuada para ambos os marcadores, todavia, um maior número de casos e estudo em separado das isoformas das proteínas P53 e P63 deve ser estimulado para confirmar e aprimorar os resultados.

**PALAVRAS CHAVE:** imunohistoquímica, TP53, P63, neoplasia e cão.

## SUMMARY

**Purpose:** Tumoral markers have been searched in order to obtain more precise information on the prognosis of the patients. The capacity of the P53 protein control apoptosis in response to DNA damage shows important implications on therapeutic practice. Although, the p63 protein has a very important play on the epidermic growth. Supporting this information, the development of new alternatives to improve the activity of these proteins is required, increasing their activity on the regulation of the neoplastic cell proliferation and the apoptosis way. The aim of this research was to evaluate by immunohistochemistry the P53 and P63 proteins in dog eyelid tumors. **Methods:** 20 cases of eyelid neoplasia (eyelid and third eyelid) were selected from the archives of two of Unesp Veterinary Pathology Service. The specimens from paraffin embedded tissues were analysed and submitted to immunohistochemistry assays. **Results:** 13 cases of squamous cell carcinoma were positive to P53 and p63 labelling, 1 case of basal cell carcinoma was positive to p53 and p63 labelling and 2 cases of sebaceous adenoma presented a minimal labelling to P53 and P63 markers. **Conclusions:** there was a trend of the P53 and P63 protein to be expressed in tumors with higher differentiation and malignant, although to confirm these results a higher number of specimens, as well as more studies of the different isoforms of the protein are necessary.

**KEY-WORDS:** Immunohistochemistry, *TP53*, P63, neoplasia and dog.

## 1 Introdução

As neoplasias, quaisquer que sejam, decorrem de alterações bioquímicas, genéticas e anatômicas de células e tecidos normais. Estas células sofrem modificações tornando-se diferenciadas das normais, inclusive nas suas propriedades; crescem autonomamente, sem ou com pouca relação com os mecanismos reguladores intra e intercelulares observados nos tecidos normais. Tais alterações podem ser geradas por agentes extrínsecos e intrínsecos, ou ainda pela combinação desses. Em cães e gatos, os fatores mais comuns são a radiação ultravioleta (UV), podendo nos casos de carcinoma epidermóide, haver uma maior atividade de enzimas do processo de apoptose (caspases), e ainda, uma forte expressão de *TP53*, sugerindo a sua mutação.<sup>1</sup> Citam-se ainda, efeitos hormonais (fatores de crescimento; esteróides) associados á uma maior sensibilidade das células tumorais e, ainda, uma alta positividade entre eles e a expressão de p53 e Bax<sup>2</sup>.

Os tumores que acometem as pálpebras e a terceira pálpebra de cães apresentam maior incidência em animais idosos (9-10 anos), algumas raças são mais predisponentes (Beagles, Husky Siberiano e Setters), e são tipicamente benignos (88% dos casos), tais como adenoma sebáceo, papilomas. Tumores malignos, incluindo adenocarcinoma, melanoma, carcinoma de células basais e de células escamosas, são infrequentes, e representam uma porcentagem em torno de 8,2% dos tumores<sup>3,4</sup>. Nestes casos, são comparativamente maiores em tamanho, mas com pequeno potencial metastático<sup>5,6</sup>. A aparência clínica da neoplasia e seus sinais clínicos variam consideravelmente de acordo com a região acometida, podendo mimetizar um processo inflamatório ocular no início até um quadro de uveíte e/ou glaucoma<sup>7</sup>.

Os métodos de tratamento mais comumente empregados para neoplasias palpebrais, tanto em seres humanos como em cães, ainda estão restritos a remoção cirúrgica do crescimento tumoral, crioterapia<sup>8</sup> e excisão a laser. As radiações ionizantes também podem

ser utilizadas, mas se limitam a alguns tipos tumorais e localizações, e ainda, podem induzir mielosupressão em cães<sup>9</sup>. O uso do Estrôncio-90 foi relatado por Andrade et al. (2003) como tratamento de carcinomas de terceira pálpebra.

O prognóstico destas enfermidades baseia-se no tempo de evolução dos tumores e na rapidez com que estes são diagnosticados. As características clínicas e o comportamento biológico são os parâmetros mais importantes a serem considerados para se instituir o prognóstico<sup>11</sup>. Características como modo e taxa de crescimento, volume total do tumor e envolvimento dos linfonodos regionais ou distantes são fundamentais para determinar prognóstico e possível tratamento. Os tumores malignos quase sempre têm um crescimento rápido<sup>12</sup>.

É de fundamental importância, também, a análise dos linfonodos regionais, pois, tumores com alto potencial metastático tem prognóstico desfavorável. O carcinoma infiltrativo está associado a um índice de recidiva significativamente mais elevado que o carcinoma não invasivo<sup>4</sup>.

Acredita-se que mutações do gene *TP53* e de sua família de genes são as alterações genéticas mais comuns em neoplasias em cães, entretanto pouco se sabe sobre o mesmo e suas mutações<sup>13, 14</sup>. Devido a grande complexidade biológica do câncer em humanos, estudos têm focado o seu alvo nos animais de companhia devido a sua semelhança nos aspectos fisiopatológicos e comportamentais na biologia do câncer. Estes animais possuem muitas características tumorais desejadas, das quais preenchem um grande lacuna entre estudos *in vivo* e *in vitro*, e estas características provam ser de extrema importância no entendimento da complexidade molecular de tumores em humanos<sup>15</sup>.

Inúmeros estudos têm tido como foco de investigação a significância do papel da família do gene *TP53* e a sua patogênese numa grande variedade de neoplasias que

acometem o homem e os cães. Entretanto, os estudos demonstram que o mesmo está expresso em pouco mais de 50% dos tumores<sup>1, 16, 17, 18</sup>. A capacidade da proteína p53 em controlar a apoptose em resposta à lesão do DNA apresenta importantes implicações terapêuticas práticas e prognóstico<sup>19</sup>. Com base nesses dados, o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento tem sido investigadas, visando aumentar a atividade da proteína p53 em regular a proliferação de células tumorais, ou induzi-las à apoptose, eliminando de forma seletiva as células tumorais com função anormal do *TP53*<sup>18</sup>. Recentemente, Lopes et al. (2010) verificaram uma elevada presença e expressão do gene supressor de tumor *TP53* e do oncogene c-Myc em tumores de anexos oculares de cães. Na maioria dos casos as mutações de inativação afetam ambos os alelos do *TP53* e são adquiridas no processo de divisão das células somáticas, porém a frequência destes eventos é baixa. O fato das mutações serem comuns em diversos tipos de tumores sugere que a proteína p53 (proteína nuclear) funciona como uma guardiã crítica contra qualquer formação do câncer. Acredita-se que a mesma esteja relacionada com a manutenção da integridade do DNA e tem suma importância no mecanismo de reparação celular. É evidente que o *TP53* age como um “policia molecular” que impede a propagação de células geneticamente lesadas e induz a apoptose em células com danos irreparáveis ao DNA<sup>18, 21, 22</sup>. Tumores que apresentam funcionalidade anormal do *TP53* são, em geral, mais resistentes à apoptose, e acumulam mutações adicionais que contribuem para a progressão da neoplasia<sup>23</sup>.

Acredita-se que mutações do gene *TP53* sejam as alterações genéticas mais comuns em tumores mamários em cadelas<sup>24</sup>, assim como outros tipos tumorais que acometem o homem e os cães<sup>1, 14, 25, 26, 27, 28, 29</sup>.

Algumas anormalidades deste gene têm sido documentadas em carcinomas de tireóide<sup>30, 31</sup>, papilomas orais<sup>32, 33</sup>, osteossarcomas<sup>19, 34</sup>, adenoma da glândula perianal<sup>35</sup> e linfomas. A super-expressão da proteína p53 também foi observada em tumores epiteliais,

mesenquimais e de células redondas<sup>25</sup>. Muto et al. (2000) detectaram algumas alterações nos éxons 5-8 em tumores mamários de cães, desde os tumores benignos até os carcinomas.

A descoberta de membros da família *TP53* revelou que este gene possui colaboradores, sendo um destes, o gene *p63*. Na verdade, *TP53* e *p63* são agentes em uma rede complexa e com uma similaridade significativa, o que é apenas começo a ser desvendado. O *TP53* tem uma expressão onipresente, enquanto *p63* mostra uma especificidade mais tecidual. Por exemplo, *p63* é essencial para a diferenciação da estratificação do epitélio escamoso, e é encontrado com maior frequência em células basais, protegendo as células da apoptose e coordenando a sua diferenciação. Além disso, o *p63* é também encontrado junto com o *TP53*, porém expressando diferentes isoformas, alguns dos quais atuam como ativadores transcricionais. Estas isoformas têm a capacidade para ativar *p53* e induzir a apoptose e bloquear o ciclo celular. No entanto, as outras três isoformas agem como dominantes negativos e suprimem a atividade de ambos *TP53* e da isoforma TAp63. Apesar homologia estrutural, não há nenhuma evidência de que *P63* é um gene supressor de tumor, como *TP53*. O *p63* também pode desempenhar um papel na replicação celular, por competição com *TP53* para ligar o DNA ou através de uma interação direta com *p53* ligado ao DNA<sup>14</sup>. Um exemplo ilustrativo das ações coordenadas destes genes é visto no tecido subconjuntal, em células basais do tecido mamário, que têm um pobre prognóstico. Estes tumores têm demonstrado uma mutação em *TP53* e *p63*, o que adicionalmente, contribui para sua quimiorresistência<sup>18</sup>. Frente ao anteriormente exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de análise imunohistoquímica, a presença das proteínas *p53* e *p63* em tumores de anexos oculares de cães.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Amostras

As amostras estudadas foram obtidas junto ao Serviço de Patologia Veterinária, onde foram selecionados 20 casos de tumores dos anexos oculares no período de 1998 a 2009, pois este estudo foi uma continuidade do projeto de pesquisa realizado pelo aluno durante seu curso de mestrado. De acordo com os princípios éticos na experimentação animal, o projeto foi considerado aprovado pela comissão da Universidade Estadual Paulista - FMVZ, com o numero de protocolo 71/2012-CEUA no dia 9 de abril de 2010.

Foram colhidos fragmentos para as seguintes análises: 1) anatomopatológica; 2) imunohistoquímica para os genes supressores de tumor p53 e p63;. Para tanto, dos blocos parafinados foram retirados cortes em secções de três micrômetros (3µm) e colocados em lâminas de vidro.

### 2.2 Avaliação Anatomopatológica dos tumores

Os fragmentos para análise anatomopatológica foram provenientes de peças cirúrgicas que foram fixadas em formol tamponado a 10 % por no mínimo 72 horas e, posteriormente, incluídos em parafina. Dos blocos foram obtidos fragmentos de 3 µm, que foram corados rotineiramente pela coloração de HE (Hematoxilina e Eosina) e analisados por microscopia de luz. As lâminas foram avaliadas por um único patologista e, posteriormente, foram documentadas por fotos junto ao Laboratório de Patologia da FMVA-Unesp, sob supervisão da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Cecília Rui Luvizotto.

### 2.3 Imunoistoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos à imunomarcção para os anticorpos *TP53* e p63 para verificação da expressão destes genes nos tumores. Inicialmente, foi realizada a desparafinização do tecido em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos. A hidratação

dos cortes foi realizada utilizando-se concentrações decrescentes de álcool. A recuperação antigênica pelo calor foi realizada em forno microondas com solução de citrato 10 mL (pH = 6.0) (2,1 g de ácido cítrico monohidratada diluídos em 1000 mL de água destilada) em duas etapas de fervura de 5 minutos cada, deixando-se o material esfriar em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e, em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de 100 mL de água oxigenada (20V) diluída em 100 mL de metanol, durante 30 minutos. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-p53 e anti-p63 – SIGMA ALDRICH®) na diluição de 1:200 para ambos os anticorpos, utilizando o diluente de anticorpos com redução de marcação de fundo (DAKO®) e por 18 horas a uma temperatura de 4<sup>0</sup>C em câmara úmida foram incubadas, e como controle negativo, não foi adicionado o anticorpo primário sobre os tecidos. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS (pH=7,4). A incubação com o “kit” LSAB (Dako®), que contempla o anticorpo secundário, ocorreu durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram submetidas à passagem em solução tampão. A revelação foi conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB DAKO®), com sucessivas lavagens em solução tampão, água corrente e água destilada. Por fim, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Mayer (Dako®), 5,0 mL por lâmina e lavagem em água destilada. As lâminas foram desidratadas em lavagens crescentes de alcoóis e xilol e, posteriormente, montadas em resina sintética.

#### *2.4 Avaliação Microscópica*

As lâminas correspondentes ao procedimento de imunohistoquímica foram analisadas em microscopia de luz e em seguida fotodocumentadas. Foi utilizado o microscópio Axio A3,

Carl Zeiss junto ao Laboratório de Virologia da FMVA – Unesp, sob auxílio da prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tereza Cristina Cardoso da Silva.

### 3 Resultados

#### 3.1 Avaliações anatomopatológica.

No total das 20 amostras, foram diagnosticados os seguintes tumores: 2 adenomas sebáceos, 2 carcinomas basocelular, 2 carcinomas sebáceos, 13 carcinomas de células escamosas (figura 1) e em uma das amostras, verificou-se o carcinoma de células escamosas e o da glândula sebácea. No quadro 01, estão apresentadas as características dos cães e do tumor nas diferentes amostras.

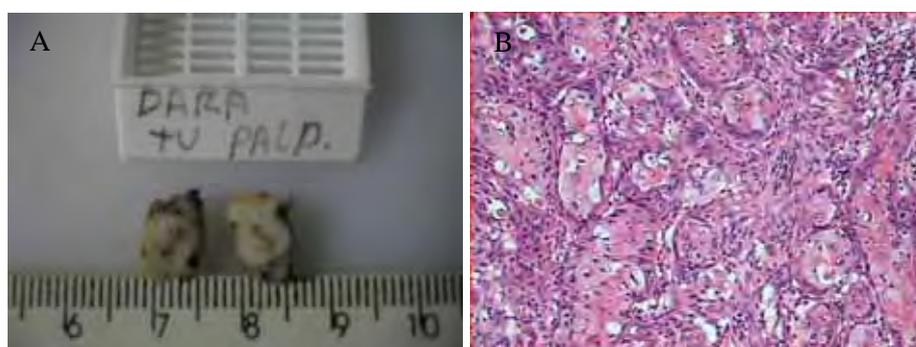


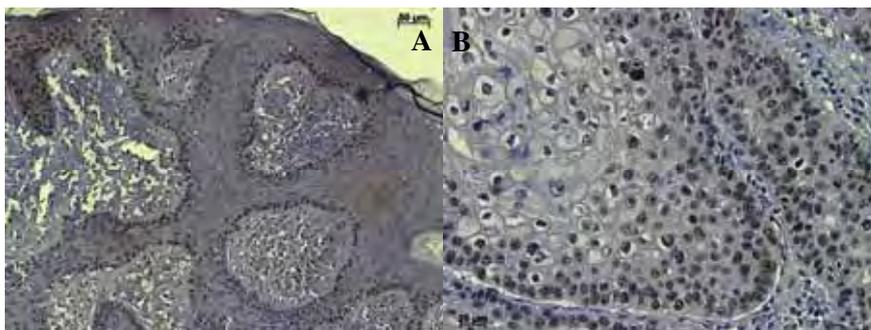
Figura 1. **A.** Aspecto macroscópico de um tumor localizado na pálpebra. **B.** Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas (tumor em A), HE, 20x.

#### 3.2 Avaliações Imunoistoquímicas.

As lâminas coradas pelo HE foram utilizadas como controle à observação das regiões imunomarcadas para o anticorpo Anti-p53 e Anti-p63.

Na imunohistoquímica, todos os fragmentos de tecido neoplásico de caráter maligno apresentaram forte expressão da proteína p53 (figura 3), porém as amostras com diagnóstico de neoplasia benigna apresentaram uma marcação menos intensa, ou seja, com um menor número de células marcadas por campo visualizado ao microscópio óptico.

No entanto, a expressão da proteína p63 foi menos intensa em todas as amostras, não havendo diferença entre o caráter maligno e benigno dos tumores. Houve uma tendência maior deste marcador a ser mais concentrado na porção basal do epitélio.



**Figura 2. A.** Fotomicrografia da imunomarcação para anticorpo Anti-p63, (20x) em tumor do tipo carcinoma sebáceo  
**B.** Fotomicrografia imunomarcação intensa (seta) para anticorpo Anti-p53, (40x) na mesma amostra.

**Quadro 1.** Distribuição das diferentes amostras avaliadas, segundo idade, raça, sexo, localização, diâmetro do tumor e diagnóstico histopatológico.

<i>Amostra</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Raça</i>	<i>Sexo</i>	<i>Localização</i>	<i>Diâmetro</i>	<i>Diagnóstico</i>
1	5	Rottweiler	F	Pálpebra superior Esquerda	0,5 cm	Carcinoma de células escamosas
2	10	Sheepdog	F	Face interior da pálpebra Superior direita	1 cm	Carcinoma de células escamosas bem diferenciado
3	8	Beagle	M	Conjuntiva da 3ª. Pálpebra, sangrante e friável	1 cm	Carcinoma de células escamosas
4	7	SRD	F	Pele periocular esquerdo, próximo comissura interna	---	Carcinoma células escamosas pouco diferenciado
5	---	Weimaraner	F	Pálpebra superior esquerda	1 cm	Carcinoma células escamosas e car. Glândula sebácea
6	7	Doberman	F	Pálpebra inferior direita, coloração escura	2	Carcinoma de células escamosas
7	2,6	SRD	M	Protrusão gl. da 3ª. Pálpebra	---	Carcinoma de células escamosas
8	5	SRD	M	Pálpebra inferior, recidiva de cirurgia há 1 ano	2 cm	Carcinoma de células escamosas (grau III)
9	9	Poodle	M	3ª. Pálpebra e pálpebra inferior direita	2 cm	Carcinoma de células escamosas (grau III)
10	9	SRD	F	Gl. 3ª. Pálpebra direita e esquerda	3 a 4 cm	Carcinoma de células escamosas
11	6	---	F	Terceira pálpebra esquerda	---	Carcinoma de células escamosas
12	8	Boxer	F	Terceira pálpebra, nódulo firme, marrom escuro	5 cm	Carcinoma de células escamosas
13	--	SRD	M	Pálpebra	2cm	Adenoma Sebáceo
14	--	SRD	M	Bulbo ocular	---	Carcinoma de células escamosas
15	--	SRD	F	Pálpebra	3cm	Carcinoma sebáceo
16	--	SRD	F	Pálpebra	2cm	Carcinoma Basocelular

17	--	<i>SRD</i>	<i>F</i>	--	<i>3cm</i>	<i>Carcinoma de células escamosas</i>
18	--	<i>SRD</i>	<i>F</i>	<i>Pálpebra</i>	<i>3cm</i>	<i>Adenoma sebáceo</i>
19	--	<i>SRD</i>	<i>F</i>	<i>Pálpebra</i>	<i>2,5cm</i>	<i>Carcinoma sebáceo</i>
20	--	<i>SRD</i>	--	--	<i>4CM</i>	<i>Carcinoma basocelular</i>

**Legenda:** SRD: sem raça definida; F: fêmea; M: macho; cm: centímetros.

#### 4 Discussão

Os avanços biotecnológicos têm permitido demonstrar a presença e a expressão de genes envolvidos na carcinogênese, o que facilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares dos diversos tipos de câncer.

O diagnóstico das neoplasias oculares é frequentemente determinado por exames anatomopatológico e/ou imunoistoquímica. O mesmo foi realizado aqui empregando a imunoistoquímica como ferramenta para a detecção dos genes supressores de tumor *TP53* e p63, e foi observada intensa imunoreatividade para estes marcadores.

O procedimento de imunoistoquímica (IHC) criou um amplo campo para uma análise funcional da morfologia (analítico ou molecular), sobretudo porque tornou os métodos de imunoperoxidase aplicáveis à rotina em tecidos conservados em parafina.<sup>36</sup> A grande vantagem da utilização de tecidos fixados em formalina é devido aos problemas oriundos de alta temperatura, quando as amostras devem ser transportadas a partir de explorações até os laboratórios. Nesse, os tecidos congelados podem ser comprometido pelas temperaturas tropicais, resultando em qualidade de amostras pobre em comparação com tecidos fixados com formalina e fixados em parafina<sup>36</sup>.

A utilização de recuperação antigênica de cortes de tecidos parafinados em soluções de pH baixo, demonstrou ser compatível com a coloração para IHC.

A expressão das proteínas p53 e p63 nos tumores de anexos oculares em cães ainda não havia sido descrita, por outros autores, utilizando a técnica de imunohistoquímica. No entanto, neste trabalho, ambas as proteínas apresentaram uma alta expressão, e principalmente nas amostras que foram diagnosticadas com um maior grau de malignidade. Montiani-Ferreira et al. (2008), ao analisarem um caso de carcinoma de células escamosas localizado na córnea, encontraram uma forte expressão de p53 nestas células neoplásicas, porém não realizaram a pesquisa para o p63. Stockmann et al. (2011) também encontraram uma alta expressão destas proteínas (92,3%) em tumor venéreo transmissível de cães e, Kirpensteijn et al. (2008) observaram uma porcentagem de 40,7% em osteossarcomas. No entanto, Chandler et al. (2009) concluíram que a p53 pode não desenvolver um papel importante no desenvolvimento tumoral ao analisarem amostras de hemangiomas e hemangiossarcomas.

A importância da expressão dessas proteínas nos tumores de anexo ocular em cães pode ser verificada, portanto um maior número de casos e estudo em separado das isoformas das proteínas P53 e P63 devem ser estimulados para confirmar esses resultados e aprimorar o conhecimento científico nessa área.

## 5 Conclusões

Com base nos resultados e as condições utilizadas no presente estudo:

- A realização da imunoistoquímica em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina é factível em carcinomas de anexos oculares de cães.
- Os carcinomas de anexos de cães, especialmente os células escamosas, apresentam uma alta atividade da p53 e da p63, sendo que a segunda é localizada, em sua grande parte, nas células mais basais do epitélio.

## 6 Referências

1. Montiani-Ferreira, F. et al. Corneal squamous cell carcinoma in a dog: a case report. *Veterinary Ophthalmology* 2008; v.11, n.4, p.269-272.
2. Dolka, I. et al. Relationship between receptors for insulin-like growth factor-I, steroid hormones and apoptosis-associated proteins in canine mammary tumors. *Polish Journal of Veterinary Science* 2011; v.14, n.2, p.245-251.
3. Roberts SM. Severin GA. Lavach JD. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *The Journal of American Veterinary Medical Association* 1986; 189(10):355-59.
4. Aquino, S.M. Management of eyelid neoplasms in the dog and cat. *Clinic Technology Animal Practice* 2007; v.22, n.2, p.46-54.
5. Hirai, T., et al. Apocrine gland tumor of the eyelid in a dog. *Veterinary Pathology* 1997; v.34, p.232-234.
6. Krehbiel JD. Langan RF. Eyelid neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1975; 36:115-119.
7. Willis AM. Wilkie DA. Ocular Oncology. *Clinical Techniques of Small Animal Practice* 2001; 16(1):77-85.
8. Dreyfus, J. et al. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. *Veterinary Ophthalmology* 2011; v.14, n.3, p.162-168.
9. Clemount, T. et al. Radiotherapy-induced myelosuppression in dogs: 103 cases (2002-2006). *Veterinary Comparative Oncology* 2012 v.10, n.1, p.24-32.
10. Andrade, A.L., et al. Clinical Trial with <sup>90</sup>Strontium low radiation for treatment of third eyelid neoplasms in dogs. 2003; On-line: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Document n°. P3028.0903.

11. Von Krosigk, F. et al. Magnetic resonance imaging and ultrasonography in dogs and cats with ocular and orbital diseases. Part 1: Ocular Diseases. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe k, Kleintiere/heimtiere*. 2012; v.40, n.1, p.7-15.
12. Roberts, S.M., Severin, G.A., Lavach, J.D. Prevalence and treatment of palpebral neoplasms in the dog: 200 cases (1975-1983). *The Journal of American Veterinary Medical Association*, 1986; v.189, n.10, p.355-59.
13. Faria, M.H.G., Rabenhorst, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2005; v.52, n.2, p.165-171.
14. Stockmann, D. et al. Detection of the tumor suppressor gene TP53 and expression of TP53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumors. *Veterinary Comparative Oncology*. 2011; v.9, n.4, p.251-259.
15. Pinho, S.S., et al. Canine Tumors: a spontaneous animal modelo f humam. *Translation Research*, 2012; v.159, n.3, p.165-172.
16. Johnson AS. Couto CG. Wegworst M. Mutation of the P53 tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. *Carcinogenesis* 1998; 19(1):213-217.
17. Carvalho, T., et al. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology*, 2005; v.42, n.1, p.66-73.
18. Robbins SL. Cotran V. Neoplasias In: *Patologic bases of Diseases*. 8ª (ed, Saunders) San Francisco –CA; 2010. 7:515 - 535.
19. Kirpensteijn, J. et al. TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery* 2008; v.37, n.5, p.454-60.
20. Lopes, R.A. et al. Occurrence and expression of p53 supressor gene And c-myc oncogene in dog eyelid tumors. *Veterinary Ophtalmology*.2010; v.13, n.2, p.69-75.

21. Jiang, W., et al. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*, 1999; v.18, p.4247-4253.
22. Muto T. Wakul S. Takahashi H. Maekawa S. Masaoka T. Ushigome S. Furusato M. P53 gene mutations occurring in spontaneous benign and malignant mammary tumors of the dog. *Veterinary Pathology* 2000; 37:248-253.
23. Levine RA. Overexpression of the sis oncogene in a canine osteosarcoma cell line. *Veterinary Pathology* 2000; 39:411-412.
24. Van Leeuwen, I.S., et al. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research*, 1996;v.16, n.6B, p.3737-3744.
25. Veldhoen, N., et al. Isolation of canine p53 cDna and detailed characterization of the full length canine p53 protein. *Oncogene*, 1998; v.16, p.1077-1084.
26. Lee C. Kweon O. Mutations of P53 tumor suppressor gene in spontaneous canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2002; 3(4):321-325.
27. Lee C. Kim W. Lim J. Kang M. Kim D. Kweon O. Mutation and overexpression of P53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2004; 5(1):63-69.
28. Zuccari, D.A., et al. Immunocytochemical study of Ki-67 as a prognostic marker in canine mammary neoplasia. *Veterinary Clinic Pathology*, 2004; v.33, n.1, p.23-28.
29. Keller, S.M., et al. A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. *Journal of Comparative Pathology*, 2007; v.37, p.59-70.
30. Devilee, P., et al. The canine p53 gene is subject to somatic mutations in thyroid carcinoma. *Anticancer Research*, 1994; v.14, n.5A, p.2039-46.

31. Tuohy, J.L. et al. Outcome following simultaneous bilateral thyroid lobectomy for treatment of thyroid gland carcinoma in dogs: 15 cases (1994-2010). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2012; v.241,n.1, p.95-103.
32. Mayr, B., et al. Sequence of an exon of the canine p53 gene--mutation in a papilloma. *Brazilian Veterinary Journal*,1994; v.150, n.1, p.81-84.
33. Teifke, J.P. et al. Detection of canine oral papillomavirus-DNA in canine oral squamous cell carcinomas and p53 overexpressing skin papillomas of the dog using the polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization. *Veterinary Microbiologic*. 1998;v.60, n.4, p.119-130.
34. Van Leeuwen, I.S., et al. P53 gene mutations in osteosarcomas in the dog. *Cancer Letters*, 1997; v.111, n.1-2, p.173-178.
35. Mayr, B., et al. Canine tumour suppressor gene p53--mutation in a case of adenoma of circumanal glands. *Veterinary Research Community* 1997; v.21, n.5, p.369-373.
36. Shi, S.R. et al. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*.2001; v.49, n. 8, p.931-937.
37. Chandler, H.L. et al. Immunohistochemical analysis of ocular hemangioma and hemangiosarcomas in dogs. *Veterinary Ophthalmology*.2009; v.12, n.2, p.83-90.

**Agradecimentos:**

- FAPESP Suporte Financeiro (processo: 2010/10450-5).
- CAPES – Bolsa no país (doutorado)