

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR E  
DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE 1 EM CÃES COM  
CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS**

**Reinaldo Juan Garrido Palacios Junior  
Médico Veterinário**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR E  
DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE 1 EM CÃES COM  
CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS**

**Reinaldo Juan Garrido Palacios Junior**

**Orientadora: Profa. Dra Mirela Tinucci Costa**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Débora Aparecida Pires de Campos  
Zuccari**

**Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Mestre Medicina Veterinária, área de Clínica  
Médica Veterinária.**

**2014**

Palacios Junior, Reinaldo Juan Garrido  
P153f Fator de crescimento do endotélio vascular e do  
transportador de glicose 1 em cães com ceratose actínica e  
carcinoma de células escamosas / Reinaldo Juan Garrido  
Palacios Junior. – – Jaboticabal, 2014  
x, 51 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientadora: Mirela Tinucci Costa  
Co-orientadora: Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari  
Banca examinadora: Sabryna Gouveia Calazans, Carolina  
Franchi João  
Bibliografia

1. Angiogênese. 2. Metabolismo. 3. Tumor cutâneo. I. Título.  
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Reinaldo Juan Garrido Palacios Junior, brasileiro, paulistano, também com nacionalidade chilena, nascido em 07 de março de 1984, progênito de Reinaldo Garrido Palacios e Marice Motta Giorgi Garrido. Realizou a primeiro e segundo graus na cidade de São Paulo, mudando-se para Jaboticabal em 2005, para realizar a graduação em Medicina Veterinária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Durante a graduação realizou estágios na área de comportamento animal, genética de bactérias e inspeção alimentar. No segundo ano da graduação iniciou estágio no Hospital “Governador Laudo Natel” nas áreas de Enfermagem de Pequenos Animais e Clínica Médica de Pequenos Animais. Também durante a graduação participou do Programa de Educação Tutorial – PET e como professor e co-ordenador do Cursinho Ativo. Sempre presente nas campanhas de castração e imunização anti-rábica em diversas cidades da região de Jaboticabal. Formou-se em 2009 e deu sequência na carreira acadêmica como Residente da Clínica Médica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

**Sinto Que Sei Que Sou Um Tanto Bem Maior**

**(Fernando Anitelli)**

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus avós das  
famílias brasileira e chilena**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais por sempre serem presentes, por descobrirem quando preciso deles sem eu pedir. Sou quem sou por causa deles e com eles que aprendi “Ser bom, mas não ser bobo”, e não ter medo de defender meus direitos e a verdade.

Agradeço aos meus avós, brasileiros e chilenos, não mais tão presentes fisicamente, mas sempre ao meu lado, que me ensinaram a ser uma família e a nunca desistir dos sonhos.

Agradeço aos meus irmãos, sempre sendo irmãos, mesmo de longe, me apoiando e dando forças para seguir meu caminho.

Agradeço à Mariana, falar quem é ela para mim aqui é repetir o que digo todos os dias, quem ela significa no meu dia a dia e a importância que ela tem para eu levantar e seguir. Sem ela, teria ficado no chão muitas vezes.

Agradeço aos meus amigos, distantes amigos e sempre ao meu lado, mas que se fizeram presentes nos momentos que mais precisei, principalmente esse ano, Carla, Daniel, Agatha e Tihara. Quem eu seria como pessoa se não fossem as palavras, risadas e lágrimas que compartilhamos...

Agradeço à minha orientadora Professora Mirela, pelos 8 anos que fui seu orientado, pelos ensinamentos na residência e mestrado, pelas oportunidades que me ofereceu e que me abriram muitos caminhos.

Agradeço a Professora Débora Zuccari, por sempre me receber, ser sempre solícita, presente no meu aprendizado e na pesquisa e disponibilizar seu laboratório para meu crescimento científico. Com seu auxílio pude pensar nesse projeto e realiza-lo.

Agradeço ao pessoal do LIMC que foram um grupo que me fez sentir em casa por todas as vezes que precisei estar em Rio Preto, com conversas, diversão e muito companheirismo. Não esquecendo a Gi, que graças a ela, tive um lugar para dormir e me fez sempre sentir à vontade.

Agradeço a Larissa, que sempre ao meu lado no experimento, torcendo por cada reação de imuno-histoquímica desse certo e cada vez que não dava, auxiliava-me a encontrar uma solução. Hoje muito sei de imuno-histoquímica por causa dela e muito desse experimento ela é responsável.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio à pesquisa concedido.

## SUMÁRIO

	Página
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas .....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Figuras .....	vii
Apêndice .....	x
1. Introdução .....	1
2. Revisão de Literatura .....	3
2.1. Ceratose Actínica .....	3
2.2. Carcinoma de Células Escamosas .....	4
2.3. Relação entre CA e CCE.....	6
2.4. Mecanismos de Progressão .....	7
2.5. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular .....	8
2.6. Transportador de Glicose 1 .....	9
3. Objetivos .....	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. Materiais e Métodos.....	12
4.1. Seleção dos animais para obtenção das amostras .....	12
4.2. Anestesia.....	12
4.3. Obtenção e Armazenamento das amostras .....	12
4.4. Histopatologia e Grupos experimentais .....	13
4.5. Imuno-histoquímica .....	16
4.6. Análise estatística.....	18
5. Resultados .....	19
5.1. Cães .....	19
5.2. Amostras .....	20
5.2.1. Avaliação histopatológica .....	20
5.2.2. Imunomarcação pelo anticorpo anti-VEGF.....	22
5.2.3. Imunomarcação pelo anticorpo anti-GLUT 1.....	25



5.2.4. Comparação das imunomarcações dos anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT1 entre os grupos com e sem administração sistêmica de anti-inflamatório não esteroideal.....	28
5.2.5. Comparação das imunomarcações anti-VEGF e anti-GLUT1 entre os grupos de cães com e sem recidiva tumoral local.....	29
6. Discussão .....	32
6.1. Cães .....	32
6.2. Avaliação histopatológica das amostras.....	34
6.3. Imunomarcação pelo anti-VEGF.....	34
6.4. Imunomarcação pelo anti-GLUT 1.....	36
6.5. Comparação das imunomarcações com os anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT1 entre os grupos com e sem administração sistêmica de anti-inflamatório não esteroideal.....	37
6.6. Comparação das imunomarcações anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre os grupos com e sem recidiva tumoral local.....	38
7. Conclusões .....	39
8. Referência.....	40

## **FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR E TRANSPORTADOR DE GLICOSE 1 EM CÃES COM CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**

**Resumo** – A pele exposta à luz UV sofre alteração nas funções e características morfológicas, isto influencia a produção local de citocinas e prejudica o reconhecimento e processamento de antígenos. A cronicidade a exposição solar na pele de cães com idades de oito a dez anos, de pelame curto e claro, com pouca pigmentação e glabra, usualmente evolui para ceratose actínica (CA) e culmina em carcinoma de células escamosas (CCE) cutâneo. Parte essencial do fenótipo maligno é a angiogênese, que tem como promotor o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) que atua nas células endoteliais. Adicionalmente a angiogênese, o crescimento das células neoplásicas requer o aumento de proteínas da membrana celular envolvidas na nutrição, como o Transportador de Glicose 1 (GLUT 1), que é essencial para a sobrevivência e proliferação das células tumorais. Assim, se propôs investigar o valor do VEGF e do GLUT 1 na progressão tumoral empregando-se para isso pele de cães que apresentavam concomitantemente a CA (Grupo CA), CCE (Grupo CCE) e pele ausente de dermatopatias (Grupo Distante de lesões), comparando-as com a pele de cães sadios sem alterações histopatológicas (Grupo Controle); também avaliar se o tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) poderia interferir nas marcações dos anticorpos, bem como avaliar se a intensidade dessas marcações diferia na pele de cães que apresentaram recidiva tumoral dos que não apresentaram. Para isso, foram selecionados 15 cães com lesões de CA e CCE e pele distante de lesões e outros 15 cães com peles normais. A intensidade da expressão do VEGF e do GLUT 1 foi investigada pelo uso da imuno-histoquímica e os resultados avaliados estatisticamente. Os Grupos CA e Distante das lesões apresentaram comportamento semelhante quanto à intensidade de marcação do VEGF; enquanto a intensidade do GLUT 1 foi semelhante nos Grupos CA e CCE. Nas amostras do grupo CA que não receberam AINEs, o VEGF apresentou maior intensidade de marcação do que o grupo CA que recebeu AINEs; já em cães que apresentaram recidiva tumoral o VEGF apresentou maior intensidade de marcação, nos tecidos dos grupos CCE e CA, comparadas aos mesmos tipos de lesões de cães que não apresentaram recidiva. Concluiu-se que o VEGF foi melhor marcador da progressão tumoral quando comparado ao GLUT 1.

**Palavras-chave:** angiogênese, metabolismo, tumor cutâneo, cão.

## **VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND GLUCOSE TRANSPORTER 1 IN DOGS WITH ACTINIC KERATOSIS AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA**

**ABSTRACT** - The skin exposed to UV light undergoes changes in morphology and function, this influences the local production of cytokines and impairs the antigen recognition and processing. The chronic sun exposure on the skin of dogs with ages of eight to ten years, short hair coat and clear, with little pigmentation and glabra, usually progresses to actinic keratosis (AK) and culminates in cutaneous squamous cell carcinoma (SCC). Essential part of the malignant phenotype is angiogenesis, which is the promoter Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) that plays on endothelial cells. Additionally angiogenesis, the growth of neoplastic cells requires increasing cell membrane proteins involved in nutrition, as the Glucose Transporter 1 (GLUT 1), which is essential for survival and proliferation of tumor cells. Thus, we proposed to investigate the value of VEGF and GLUT 1 in tumor progression employing for this skin of dogs concomitantly presented the AK (AK group), SCC (SCC Group) absent from skin diseases and skin (Lesions distant Group), comparing them with the skin of healthy dogs without histopathological changes (Control Group); also evaluate whether treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may interfere with markings of antibodies, as well as evaluating the intensity of these markings differed in the skin of dogs with tumor recurrence of which did not. For this, 15 dogs were selected with AK and SCC lesions and with lesions distant skin and 15 dogs with normal skin. The intensity of expression of GLUT 1 and VEGF was investigated by use of immunohistochemistry and the results were evaluated statistically. The AK and Lesions distant Groups showed similar behavior as the intensity staining of VEGF; while the intensity of GLUT 1 was similar in AK and SCC Groups. Samples from the AK Group who did not receive NSAIDs, VEGF showed higher intensity staining than the AK group receiving NSAID; already in dogs with tumor recurrence VEGF showed higher intensity staining in the tissues of SCC and AK Groups, compared to the same types of injuries to dogs that showed no recurrence. It was concluded that VEGF was top scorer in tumor progression when compared to GLUT 1.

**Keywords:** angiogenesis, metabolism, skin tumors, dog.

## LISTA ABREVIATURAS

AINE	anti-inflamatório não esteroide
CA	ceratose actínica
CCE	carcinoma de células escamosas
CEUA	Conselho de Ética no Uso de Animais
COX	ciclo-oxigenase
DAB	diaminobenzidina
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FCAV	Faculdade Ciências Agrárias e Veterinária
GLUT 1	Transportador de Glicose1
HIF	Fator Induzido por Hipóxia
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular do Câncer
PBS	solução salina tamponada com fosfato
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
UV	ultra-violeta

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1 Anticorpos primários, clones, tecidos controles e diluições utilizadas nas reações de imuno-histoquímica.....	17
Tabela 2 Comparação estatística da imunomarcção pelo anticorpo anti-VEGF, pelo teste de Kruskal-Wallis, do grupo Controle e dos grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.....	24
Tabela 3 Comparação estatística da imunomarcção pelo anticorpo anti-VEGF, pelo teste de Kruskal-Wallis, entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.....	24
Tabela 4 Comparação estatística da imunomarcção pelo anticorpo anti-GLUT1, pelo teste de Kruskal-Wallis, do grupo Controle e dos grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.....	27
Tabela 5 Comparação estatística da imunomarcção pelo anticorpo anti-GLUT1, pelo teste de Kruskal-Wallis, entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.....	27

## LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Ilustração dos mecanismos de progressão tumoral da ceratose actínica a carcinoma de células escamosas.....	10
Figura 2	Demonstração dos locais de coleta das amostras de carcinoma de células escamosas (setas vermelhas), ceratose actínica (setas pretas) e pele distante de lesões (seta azul) em cão. Jaboticabal, 2014.....	14
Figura 3	Demonstração da área de coleta de amostra em cão do grupo Controle (região tricotomizada). Jaboticabal, 2014.....	15
Figura 4	Ilustração demonstrativa da formação dos grupos experimentais	15
Figura 5	Ilustração demonstrativa da obtenção dos pontos de imunomarcção na análise densitométrica.....	18
Figura 6-A	Fotomicrografia de pele de cão ausente de dermatopatia, do grupo Controle, demonstrando epiderme com três camadas de ceratinócitos e polarização das células (100x).....	21
Figura 6-B	Fotomicrografia de pele essencialmente normal, de cão com carcinoma de células escamosas, apresentando cinco camadas de ceratinócitos e leve irregularidade da linearidade da membrana basal (400X).....	21
Figura 6-C	Fotomicrografia de ceratose actínica de cão, mais de cinco camadas de ceratinócitos, irregularidade da linearidade da membrana basal e projeções da epiderme à derme (100X).....	21
Figura 6-D	Fotomicrografias de carcinoma de células escamosas cutâneo, em cão, apresentando perda da arquitetura da epiderme, projeções da epiderme à derme, ilhas de ceratinócitos e irregularidade da membrana basal (400X).....	21
Figura 7-A	Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas cutâneo em cão mostrando os citoplasmas dos ceratinócitos imunomarcadas com o anticorpo anti-VEGF (100X).....	23

Figura 7-B	Fotomicrografia de ceratose actínica em cão mostrando os citoplasmas dos ceratinócitos, em todas as camadas da epiderme, imunomarcados com o anticorpo anti-VEGF (100X)....	23
Figura 7-C	Fotomicrografia de pele essencialmente normal de cão acometido com CCE cutâneo, mostrando que a imunomarcação com o anticorpo anti-VEGF se apresenta com maior intensidade na camada mais externa (400X).....	23
Figura 7-D	Fotomicrografia de pele normal, de cão ausente de dermatopatia, com intensidade do anticorpo anti-VEGF dispersa no citoplasma dos ceratinócitos (400X).....	23
Figura 8	Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras dos grupos Controle, Distante de lesões, CA e CCE, para o anticorpo anti-VEGF, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.....	25
Figura 9-A	Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas cutâneo mostrando imunomarcação da membrana basal dos ceratinóticos por anticorpo anti-GLUT 1 (400X).....	26
Figura 9-B	Fotomicrografia de ceratose actínica de cão mostrando em todas as camadas as membranas celulares dos ceratinócitos imunomarcados com o anticorpo anti-GLUT 1 (400X).....	26
Figura 9-C	Fotomicrografia de pele essencialmente normal de cão com CCE, apresentando imunomarcação forte, pelo anticorpo anti-GLUT 1, principalmente na camada basal (400X).....	26
Figura 9-D	Fotomicrografia de pele normal de cão ausente de dermatopatia, apresentando a imunomarcação pelo anticorpo anti-GLUT 1, dispersa pelas membranas celulares dos ceratinócitos, sem que haja um padrão (400x).....	26
Figura 10	Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras dos grupos Controle, Distante de lesões, CA e CCE, para o anticorpo anti-GLUT 1, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014...	28

Figura 11	Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que receberam e não receberam AINE, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.....	29
Figura 12	Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que apresentaram e não apresentaram recidiva do tumor, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.....	30
Figura 13	Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que apresentaram e não apresentaram recidiva do tumor, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.....	31



**APÊNDICE**

	Página
Desparafinização e Reidratação dos corte histológicos .....	52

## 1. Introdução

A diferenciação entre a ceratose actínica (CA) e o carcinoma de células escamosas (CCE) cutâneo é um desafio para o diagnóstico clínico. Mesmo entre os dermatologistas humanos existe uma grande divergência para o diagnóstico e tratamento, que se baseiam nos achados clínicos e histopatológicos. A CA pode ser considerada uma lesão pré-neoplásica, entretanto é impossível prever quando poderá evoluir para um CCE (STOCKFLETH; KERL, 2006). A grande dificuldade, diante destas lesões, está em escolher o melhor tratamento e em estabelecer o prognóstico do paciente; enquanto a CA pode apresentar uma resposta satisfatória à proteção solar e com bom prognóstico, no CCE normalmente há necessidade de intervenção cirúrgica e quimioterapia, com o prognóstico dependente da gravidade e presença de metástases. Adicionalmente, sabe-se que a CA poderá evoluir para CCE, contudo, não se sabe quando isso poderá ocorrer.

No que concerne à ocorrência de metástase para linfonodos regionais em humanos com CCE facial (orelhas), há taxas descritas na literatura de 4% a 37% (WERMKER et al., 2014), enquanto que não são disponíveis dados acerca das taxas de metástase no CCE cutâneo canino. Também, o CCE oral em humanos costuma apresentar metástase em até 50% dos casos (RUSSELL et al., 2011), embora o mesmo comportamento não seja observado em cães (NEMEC et al., 2014).

Em humanos, 82,4% dos pacientes apresentavam CCE e CA concomitante e, nestes, 26,7% das lesões de CA evoluíram para CCE (MITTELBRONN et al., 1998). Adicionalmente, Hurwitz e Monger (1995) verificaram que 97% de 459 casos de CCE cutâneo em humanos ocorreram próximos a uma lesão de CA, destacando a importância do reconhecimento e tratamento precoces. Agregar outros parâmetros que possam contribuir para se conhecer a evolução desses tumores poderia contribuir enormemente para se estabelecer um prognóstico ao animal.

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) age especificamente nas células endoteliais e é considerado o principal promotor da angiogênese *in vivo* e de estimular a proliferação endotelial *in vitro*. Paralelamente a angiogênese, o crescimento das células neoplásicas requer alteração no metabolismo celular, o qual influencia a intensidade de proteínas de superfície da membrana celular envolvidas

na nutrição. Uma das proteínas é o Transportador de Glicose (GLUT) 1, essencial para a sobrevivência e proliferação das células tumorais.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa investigaram fatores prognósticos, como o VEGF e E-caderina no CCE (JOÃO, 2008; JOÃO et al., 2011), COX-2 e Ki-67 no CCE e na CA (POGGIANI et al., 2012) em cães. Neste sentido, este trabalho investigou o VEGF e o GLUT 1 como possíveis marcadores prognósticos na CA, no CCE em pele de cães.

## **2. Revisão de Literatura**

A epiderme é constituída por epitélio estratificado, pavimentoso e ceratinizado, subdividida em estratos basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (WEBB; CALHOUN, 1954). Quatro são os tipos celulares: os ceratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (BACHA; WOOD, 1990; BANKS, 1992; MONTEIRO-RIVIEREET al., 1993; GROSS et al., 2009). Os ceratinócitos migram constantemente para formar os diferentes estratos epidérmicos (BANKS, 1992; MONTEIRO-RIVIEREET al., 1993) de modo que o estrato basal é o berço das células da epiderme, enquanto que a queratina é o produto da diferenciação dos ceratinócitos basais (SCOTT et al., 2001). A epiderme é uma estrutura dinâmica constantemente renovada pela descamação do estrato córneo (KRISTENSEN, 1975). Alguns autores consideram que a diferenciação final da epiderme em estrato córneo é uma forma especializada de apoptose (MCCALL; COHEN, 1991; POLAKOWSKA et al., 1994).

A frequente exposição à radiação ultravioleta (UV), principalmente em áreas hipopigmentadas, não pigmentadas e/ou com escasso manto piloso, altera as funções e características morfológicas das células de Langerhans, além de influenciar a produção local de citocinas, o que prejudica o reconhecimento e processamento de antígenos (SCOTT et al., 2001). A exposição prolongada à luz solar promove danos diretos e indiretos ao DNA dos ceratinócitos epidérmicos que, por sua vez, podem sofrer transformação maligna e progredir da ceratose actínica (CA) para o carcinoma de células escamosas (CCE) invasivo, sendo o gene supressor tumoral p53 um dos principais alvos do dano solar. Além disso, doenças que causem despigmentação (pênfigo eritematoso, vitiligo e lúpus eritematoso discóide), podem predispor os pacientes a dano actínico e conseqüentemente, ao desenvolvimento do carcinoma espinocelular (GROSS et al., 2009).

### **2.1. Ceratose Actínica**

A CA é uma lesão bem documentada no homem (ORTONNE, 2002; COCKERELL, 2003; LEBWOHL, 2003) e em cães e gatos (ALMEIDA et al., 2001). As lesões são observadas, principalmente, em cães mais velhos, com idade média

de nove anos, porém já relatadas em animais mais jovens (GROSS et al., 2005). As lesões surgem em áreas cronicamente expostas ao sol, menos pigmentadas e glabras como abdômen ventral e lateral, flanco, parte medial de membros pélvicos e face (GROSS et al., 2005). As raças Dálmata, American Staffordshire Terrier, Beagle, Basset Hound, Bull Terrier, Boxer (SCOTT et al., 2001) e Pit Bull (POGGIANI et al., 2012) apresentam maior predisposição.

As lesões iniciais caracterizam-se por placas eritematosas e espessas. Em decorrência da cronicidade, as lesões variam de eritema focal com crostas e descamação, pápulas e máculas mal definidas, a placas e nódulos ceratóticos, endurecidos, com crostas escurecidas. Erosões e úlceras com crostas hemorrágicas podem ocorrer (GROSS et al., 2005).

Na histopatologia, as alterações epidérmicas são variáveis e dependem do estágio da doença. Os principais achados são hiperplasia e displasia na epiderme, sem invasão da membrana basal (GROSS et al., 2005), atipia da epiderme e do epitélio superficial do folículo piloso, hiperkeratose e parakeratose (SCOTT et al., 2001).

Lesões iniciais apresentam melhora clínica com o uso de fotoprotetores e evitando-se a exposição ao sol. Lesões avançadas requerem a utilização de retinoides sistêmicos como a isotretinoína, etretinato ou cetretina, além da criocirurgia ou remoção cirúrgica (SCOTT et al., 2001).

Contudo, um dos maiores desafios no diagnóstico da CA, com grande divergência no diagnóstico mesmo entre dermatologistas humanos, é a distinção deste com um CCE em estágio inicial (BERMAN et al., 2006; STOCKFLETH; KERL, 2006).

## **2.2. Carcinoma de Células Escamosas**

O CCE cutâneo é uma neoplasia invasiva e maligna (ALMEIDA et al., 2001; SCOTT et al., 2001), que representa cerca de 5% dos tumores cutâneos dos cães (THOMAS; FOX, 1998).

Cães com idade de oito a dez anos são os mais acometidos, embora também possa ocorrer em animais jovens (THOMAS; FOX, 1998; ALMEIDA et al., 2001; GROSS et al., 2005). Cães de raças de pelos curtos e pele branca ou albina são os

que apresentam maior incidência de CCE cutâneo induzido pela luz solar (SCOTT et al., 2001); raramente pode ocorrer em cães com pele pigmentada e manto piloso abundante (GROSS et al., 2005). As raças predispostas, segundo a literatura internacional, são o Terrier Escocês, Pequinês, Boxer, Poodle, Elkhound Norueguês, Teckel, Dálmata, Dogue Alemão, Beagle (THOMAS; FOX, 1998; SCOTT et al., 2001; GROSS et al., 2005); Pit Bull (POGGIANI et al., 2012) e os cães sem definição racial (JOÃO, 2008) são frequentemente diagnosticados com CCE no Brasil.

Como mencionado anteriormente, o CCE cutâneo pode ser precedido pela CA, por cistos foliculares (SCOTT et al., 2001) e dermatopatias que causem despigmentação como pênfigo, lúpus eritematoso discoide e vitiligo (SCOTT; MILLER JR, 1995; GROSS et al., 2005). As lesões ocorrem mais comumente no tronco, membros, dígitos, escroto, lábios, narinas, pálpebras e pavilhão auricular (THOMAS; FOX, 1998; SCOTT et al., 2001; GROSS et al., 2005). Em cães, o CCE cutâneo pode clinicamente se apresentar como uma lesão proliferativa, que varia de uma placa eritematosa e firme a uma lesão com aspecto de “couve-flor” que tende a ulcerar; ou uma lesão erosiva, que inicialmente é crostosa e rasa, evoluindo para uma úlcera profunda (WITHROW; VAIL, 2007).

A histopatologia do CCE cutâneo normalmente revela a presença de massas irregulares de células escamosas, com origem nos ceratinócitos, que proliferam e invadem a derme e o subcutâneo. Um grande número de pérolas córneas está presente nos tumores bem diferenciados, compostas por camadas de células escamosas que aumentam gradualmente sua ceratinização em direção ao centro, além de pontes intercelulares evidentes, mitoses e atipia (SCOTT et al., 2001). As células são grandes e arredondadas, possuem citoplasma eosinofílico abundante e núcleo picnótico (GROSS et al., 2005).

As modalidades de quimioterapia intra-lesional utilizando a cisplatina ou a carboplatina, fototerapia, crio-cirurgia, eletrocirurgia, hipertermia local, radioterapia e eletroquimioterapia são indicadas no tratamento do CCE, de acordo com o tamanho, localização e progressão das lesões. A quimioterapia sistêmica (por exemplo, carboplatina ou doxorrubicina) pode ser realizada, embora seus resultados isoladamente não sejam animadores (MEDLEAU; HNILICA, 2006). O prognóstico é melhor para os tumores bem diferenciados, enquanto os tumores com alto grau de

invasão e margens pobremente definidas apresentam prognóstico ruim, com recorrência frequente após o tratamento (SCOTT et al., 2001).

Com finalidade preventiva, recomenda-se o uso de filtro solar com fator de proteção 30 ou superior nas áreas sabidamente mais acometidas (pinas, plano nasal, narinas e abdômen) além de evitar a exposição solar demasiadamente longa e sem supervisão (MEDLEAU; HNILICA, 2006; RONDELLI, 2012).

### **2.3. Relação entre CA e CCE**

É impossível prever quando a CA tornar-se-á mais espessa e invasiva, com potencial de crescimento destrutivo e de desenvolvimento do CCE metastático, inexistindo clinicamente uma distinção (STOCKFLETH; KERL, 2006).

Para alguns autores não há diferença patobiológica entre a CA e o CCE, pois ambos representam a continuação de uma doença (ORTONNE, 2002; LEBWOHL, 2003; RÖWERT-HUBER et al., 2007). Além disto, a inflamação está associada à progressão da CA para o CCE, pois há uma perda gradual da diferenciação, levando à malignidade (ORTONNE, 2002).

Mittelbronn et al. (1998) pesquisaram se poderia existir uma associação significativa entre a presença do CCE cutâneo e a CA pré-existente em humanos pela análise de históricos médicos e de banco de biopsias, concluindo que 82,4% dos pacientes apresentavam concomitante essas lesões nas biopsias de pele, sugerindo uma forte correlação entre elas. Adicionalmente, observaram que 26,7% dos CCE evoluíram de uma CA. Também, Hurwitz e Monger (1995) verificaram que 97% de 459 casos de CCE cutâneo em humanos ocorreram próximos a uma lesão de CA, destacando a importância do reconhecimento e tratamento precoces.

Outros pesquisadores também perceberam esta associação em cães. Hargis et al. (1977) avaliaram 423 cães da raça Beagle com CA e destes, 13 evoluíram para o CCE. Corroborando essas observações, Poggiani et al. (2012) ao avaliarem as expressões da cicloxigenase 2 (COX-2) e do Ki-67 em CA e CCE da pele de cães, concluíram que a CA se comportou de forma semelhante ao CCE cutâneo, sugerindo não ser uma lesão pré-neoplásica, mas sim o estágio inicial da neoplasia propriamente dita.

#### 2.4. Mecanismos de Progressão

Acredita-se que o mecanismo pelo qual a luz UV leva à progressão da CA para o CCE seja a mutação do gene supressor de tumor p53 (MORTIER et al., 2002; LEBWOHL, 2003), o que foi confirmado por Ortonne (2002) em humanos com CA. Neles, a incidência de mutação no gene p53 oscilou em torno de 75-80%.

Eventos de transformação específica, como mutação oncogênica ou inativação da p53, podem também resultar na indução da expressão do gene do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (NEUFELD et al., 1999) e aumentar com a progressão do câncer (BOWDEN et al., 2002), com o VEGF parecendo realizar o papel central no processo de angiogênese (FOLKMAN, 1990).

A angiogênese é o processo no qual novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir do endotélio de um vaso pré-existente, seguido do recrutamento de vasos aos tecidos alvos, de acordo com a necessidade específica do tecido (FOLKMAN; SHING, 1992; RUHRBERG, 2003); enquanto que a vasculogênese é a formação do suprimento vascular necessária para o desenvolvimento e diferenciação de um órgão durante a embriogênese (JOHNSTONE; LOGAN, 2006), que ocorre em vários estágios, começando com a formação do plexo do vaso a partir de uma única célula precursora (RUHRBERG, 2003). Segundo Folkman (1990), a angiogênese é parte essencial do fenótipo maligno, pois tumores sólidos não têm a habilidade de exceder 1-2 mm<sup>3</sup> de seu volume sem o desenvolvimento de neovascularização e, favorecendo a ocorrência de metástase.

Para que haja mudança no fenótipo angiogênico, deve haver a liberação de uma rede de fatores angiogênicos positivos, como o fator de crescimento básico do fibroblasto, o fator de crescimento derivado das plaquetas, o endotélio-1 e o VEGF. Muitos tipos celulares, incluindo as células tumorais, produzem o VEGF, enquanto que as células endoteliais vasculares têm receptores para este (BOWDEN et al., 2002).

Adicionalmente à angiogênese, o desordenado crescimento das células neoplásicas requer alteração no metabolismo celular, influenciando a expressão de proteínas de superfície da membrana celular envolvidas na nutrição, oferta hídrica e homeostase eletrolítica. Uma das proteínas, que é responsiva à hipóxia, é o



Transportador de Glicose (GLUT) 1 (AIRLEY; MOBASHERI, 2007). Na Figura 1 estão resumidos os principais mecanismo.

## 2.5. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

O VEGF é uma glicoproteína dimérica de 46 kDa ligado à heparina que age diretamente nas células do endotélio vascular, de forma parácrina, capaz de induzir angiogênese em situações fisiológicas e patológicas. Agindo especificamente nas células endoteliais, é considerado o principal promotor da angiogênese *in vivo* e de estimular a proliferação endotelial *in vitro* (DVORAK et al., 1995; NEUFELD et al., 1999). As múltiplas funções do VEGF estão baseadas em sua habilidade de induzir respostas nas células endoteliais durante o desenvolvimento vascular, incluindo a proliferação celular, migração, especialização e sobrevivência (FERRARA et al., 2003; RUHRBERG, 2003). Durante a morfogênese vascular, o VEGF promove a diferenciação de precursores celulares às células endoteliais e suas formações iniciais a um plexo vascular primário (RUHRBERG, 2003).

No crescimento tumoral, as células centrais da massa são privadas de oxigênio, pela distância de um vaso sanguíneo, causando hipóxia. Isto resulta na estimulação do gene do VEGF, de elementos responsivos a esta condição e do Fator Induzido por Hipóxia 1 (HIF-1), culminando na produção do VEGF (FORSYTHE et al., 1996; DAMERT et al., 1997). Para a proliferação e migração de células endoteliais, o VEGF induz o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos do tumor, através dos quais as proteínas podem extravasar (CARMELI et al., 2003; AUGUSTE et al., 2005), produzindo também colagenase e outras enzimas degradativas que facilitam a saída de células neoplásicas para a circulação (MOSCATELLI et al., 1981). Desta forma, o crescimento tumoral e a ocorrência de metástase estão associados com a angiogênese (FOLKMAN, 1971; CRESSEY et al., 2005), assim como o VEGF poderia ser vinculado a hipóxia e a progressão maligna (WEIDNER, 1995; HOCKEL et al., 1996).

Alguns estudos na medicina humana demonstraram que a expressão do VEGF pode ser fator prognóstico independente em pacientes com câncer de mama (RELF et al., 1997), câncer de cólon (TAKAHASHI et al., 1995), CCE de esôfago (UCHIDA et al., 1998), CCE de cavidade oral (UEHARA et al., 2004),

adenocarcinoma e CCE da cérvix (SATIN et al., 1999), carcinoma de células basais e CCE cutâneas (BOWDEN et al., 2002) e câncer vulvar (OBERMAIR et al., 1996). Em cães, trabalhos relacionam a expressão do VEGF com a malignidade e o prognóstico em tumores (REBUZZI et al., 2007; QUEIROGA et al., 2011). Restucci et al. (2002) demonstraram, em tumores mamários caninos benignos e malignos, relação entre a maior expressão do VEGF, a malignidade e a densidade da microvasculatura, concluindo que a malignidade e a angiogênese aumentam concomitantemente. O mesmo grupo de pesquisadores (RESTUCCI et al., 2003) também estabeleceram a mesma relação em testículos normais e em seminomas de cães. Platt et al. (2006) estudaram a expressão do VEGF em meningiomas de cães, nos quais a maior expressão da proteína foi relacionada com o menor tempo de sobrevivência. Maiolino, Vico e Restucci (2000) e João (2008) quantificaram o VEGF no CCE e nos tumores de células basais da pele de cães, demonstrando maior expressão no CCE, sugerindo que este parâmetro pode ser útil para se estabelecer o prognóstico.

## **2.6. Transportador de Glicose 1**

Com o crescimento tumoral ocorre alteração na expressão de uma proteína de superfície da membrana celular, o GLUT 1 (AIRLEY; MOBASHERI, 2007), membro dos transportadores de glicose dependentes de sódio, o qual é ativado pelo HIF-1 na ausência ou escassez de oxigênio. O GLUT 1 também é regulado por fatores de crescimento, cálcio, hormônio da tireóide, concentração baixa de glicose, transformação oncogênica e inibição da fosforilação oxidativa (BEHROOZ; ISMAILBEIGI, 1997).

Trabalhos relacionados à biologia tumoral em humanos e roedores indicam expressão alterada dessa proteína de membrana em células tumorais, comparadas aos seus homólogos normais (BRAHIMI-HORN; POUYSSÉGUR, 2007). O transporte de glicose é essencial para a sobrevivência e proliferação das células tumorais, cuja acelerada glicólise e aumento da captação de glicose facilitam o crescimento celular descontrolado (FREEMAN et al., 2010). O GLUT 1 foi observado em uma variedade de tumores humanos (YAMAMOTO et al., 1990; YOUNES et al., 1996), incluindo o CCE de cabeça e pescoço (MELLANEN et al., 1994; REISSER et

al., 1999) e o CCE oral (KUNKEL et al., 2003). Associações relacionadas entre a expressão do GLUT 1 e os índices proliferativos podem ter significância para o prognóstico em humanos com tumores. Também, um estudo mostrou associação positiva entre o carcinoma mamário invasivo e a expressão do GLUT 1 em cães (ALÒ et al., 2001), e por sua vez, poderia figurar como marcador prognóstico em neoplasias mamárias caninas (FREEMAN et al., 2010).

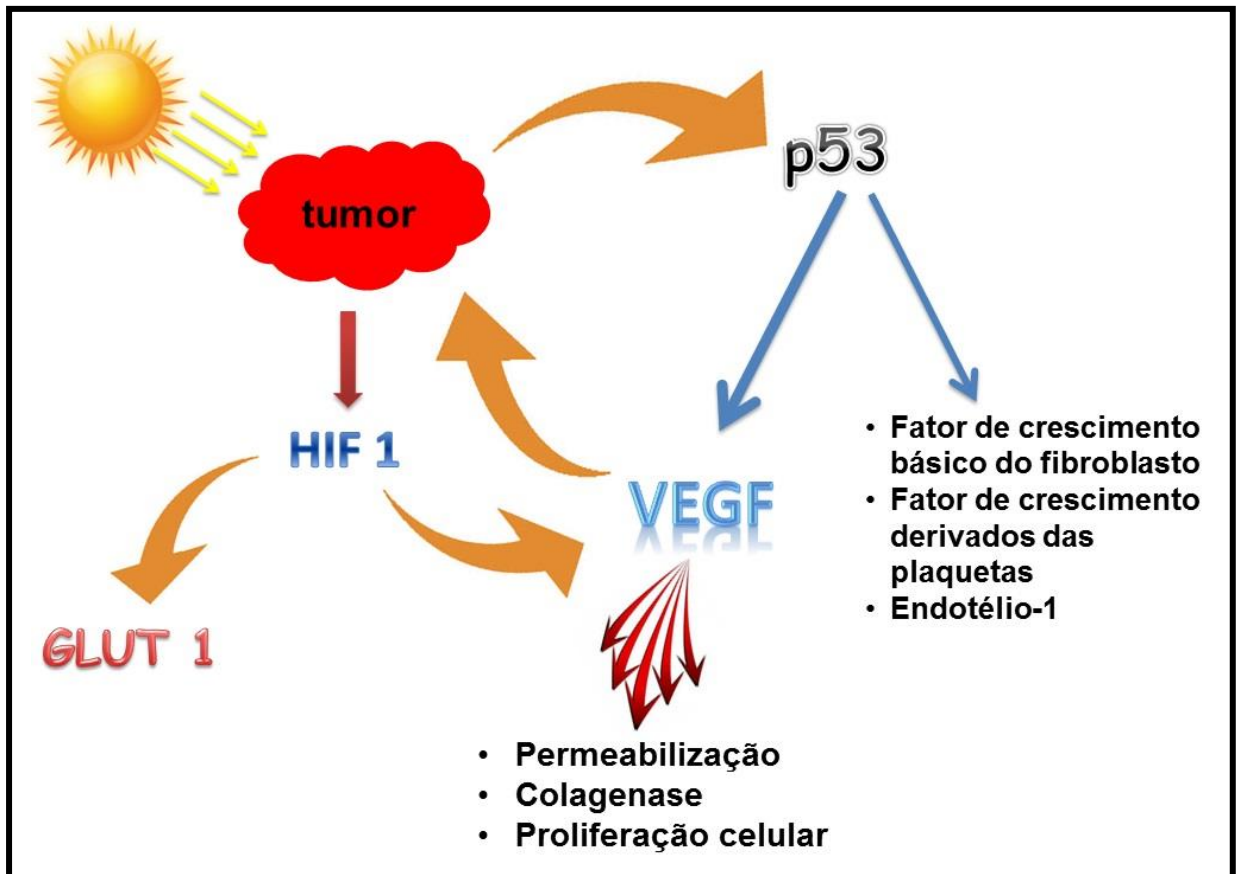


Figura 1. Ilustração dos mecanismos de progressão tumoral da ceratose actínica a carcinoma de células escamosas.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi pesquisar e avaliar se o estímulo à neovascularização (VEGF) juntamente com o incremento do metabolismo energético (GLUT 1) poderiam indicar a progressão da ceratose actínica a carcinoma de células escamosas na pele de cães.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar a população de cães com CA e CCE deste estudo;
- Investigar a intensidade de expressão do VEGF e do GLUT1 na CA e no CCE cutâneos por imuno-histoquímica;
- Quantificar as expressões do VEGF e do GLUT 1 nos CCE e CA cutâneos, nas peles sem alterações dos mesmos cães e comparar com as obtidas na pele de cães controle (sem alterações histopatológicas);
- Avaliar se o tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais podem interferir nas expressões dos anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT 1 nos CCE cutâneos, nas CA e nos tecidos sem alteração clínica dos cães com tumores;
- Comparar as expressões do VEGF e do GLUT 1 nos CCE cutâneos, nas CA e nos tecidos sem alteração clínica dos cães com tumores que apresentaram recidiva do tumor e os que não apresentaram.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1. Seleção dos animais para a obtenção das amostras**

Foram selecionados 15 (quinze) cães da rotina dos serviços de Dermatologia Veterinária e Oncologia Veterinária do HV/FCAV/Unesp, câmpus de Jaboticabal, com lesões cutâneas clínicas de CA e CCE e com pele sem alteração cutânea. Para inclusão dos mesmos, também, deviam apresentar histórico clínico de lesão cutânea crônica e longos períodos de exposição ao sol. Posteriormente ao diagnóstico clínico, a confirmação se deu por exame histopatológico.

Para compor o grupo controle, foram selecionados 15 (quinze) cães do canil e da rotina do HV/FCAV/Unesp, sem afecção cutânea clinicamente detectável e sem histórico de exposição crônica ao sol. Esses cães que foram submetidos a cirurgias eletivas, com consentimento livre e esclarecido de seus proprietários foram coletados fragmentos de pele durante a cirurgia com auxílio de um *punch* 6. O exame histopatológico confirmou se tratar de pele essencialmente saudável.

A seleção dos cães independia da raça, cor e porte.

O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta unidade universitária (protocolo 025174/12).

### **4.2. Anestesia**

O protocolo anestésico foi o adotado pelo Serviço de Cirurgia do HV/FCAV/Unesp, câmpus de Jaboticabal. Resumidamente, como medicação pré-anestésica foi utilizado o cloridrato de tramadol (3,0 mg/kg, por via intramuscular) e, após 15 minutos, os cães foram induzidos com meperidina (0,3 mg/kg, por via intravenosa) e propofol (3mg/kg, por via intravenosa), então foram mantidos com propofol no estágio III de Guedel, no plano 2. Quando necessária, anestesia inalatória com isoflurano era fornecida até o término do procedimento.

### **4.3. Obtenção e Armazenamento das amostras**

Nos locais das lesões sugestivas de CA e CCE e de pele sem alteração clínica foram realizadas tricotomia e anti-sepsia prévias. Para as biopsias incisionais utilizaram-se *punch* de 6 mm descartável e, posteriormente, sutura dos locais com

fio náilon 3-0. Nas biopsias excisionais seguiram-se incisão e sutura segundo conduta do cirurgião. Coletas de linfonodo(s) reativo(s) e envio para histopatologia também foram realizados.

As amostras foram armazenadas em frascos individuais, previamente identificados, contendo formalina a 10% tamponada com fosfato, respeitando-se o mínimo de dez partes de formalina para uma parte de tecido. Após 24 horas, as amostras foram transferidas para álcool 70%, visando a preservação dos epítomos antigênicos e otimização das reações de imuno-histoquímica.

#### **4.4. Histopatologia e Grupos experimentais**

Dos 15 cães foram coletadas amostras de lesões cutâneas crônicas com aspecto clínico de CCE, podendo ou não ser ulceradas; amostras de lesões próximas às de CCE com aspecto de CA, segundo descrito por Hurwitz e Monger (1995), que observaram a ocorrência das CA próximas aos CCE em 97% dos pacientes humanos; ainda amostras de pele com ausência de lesão, distantes pelo menos 10 cm dos locais de coletas das amostras de CA e CCE (Figura 2). Em três pacientes não se conseguiu coletar amostras de CA, mesmo seguindo os critérios adotados em todas as coletas, pois não se obtinha a confirmação histopatológica como esperado. Devido a isso foram coletadas seis amostras, de diferentes locais, com aspecto de CA de um mesmo animal para assim, compor os grupos experimentais. Outras 15 amostras de pele de cães sem alterações histopatológicas coletadas de abdômen ou dorso formaram o grupo Controle (Figura 3).

Após as coletas, todas as amostras foram processadas e remetidas ao Laboratório Werner & Werner, Curitiba-PR, especializado em dermatopatologia, onde foram submetidas ao diagnóstico histopatológico, e formados os grupos experimentais: distante de lesões, CA e CCE e Grupo controle (Figura 4):

- **Grupo Distante de lesões (n=15):** amostras de pele com ausência de lesão de cães com CCE e CA;
- **Grupo CA (n=15):** amostras de ceratose actínica
- **Grupo CCE (n=15):** amostras de carcinoma de células escamosas;
- **Grupo Controle (n=15):** amostras de pele de cães isentos de dermatopatias, macro e microscopicamente livres de lesão.

Diante da formação dos grupos citados, estes foram separados em blocos seguintes análises, a se conhecer:

- **Bloco 1:** Análise da intensidade da imunomarcção do anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre o grupo Controle e grupos CCE, CA e Distante de lesões;
- **Bloco 2:** Análise da intensidade da imunomarcção do anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre os grupos CCE, CA e Distante de lesões;
- **Bloco 3:** Análise da intensidade da imunomarcção do anti-VEGF e anti-GLUT 1 nos grupos CCE, CA e Distante de lesões, em cães com (n=8) e sem (n=7) administração de AINEs;
- **Bloco4:** Análise da intensidade da imunomarcção do anti-VEGF e anti-GLUT 1 nos grupos CCE, CA e Distante de lesões, em cães que apresentaram recidiva (n=6) e não apresentaram recidiva tumoral (n=9).

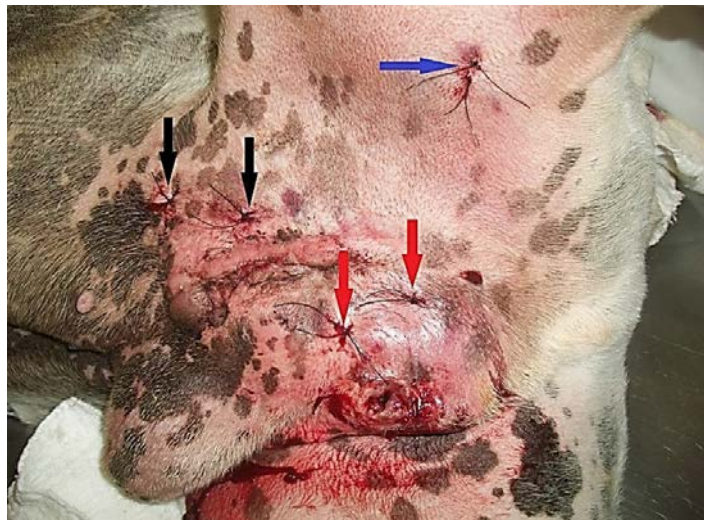


Figura 2. Fotografia ilustrativa mostrando os locais de coleta das amostras de carcinoma de células escamosas (setas vermelhas), ceratose actínica (setas pretas) e pele distante de lesões (seta azul) em cão. Jaboticabal, 2014.



Figura 3. Fotografia ilustrativa mostrando a área de coleta de amostra em cão do grupo Controle (região tricotomizada). Jaboticabal, 2014.

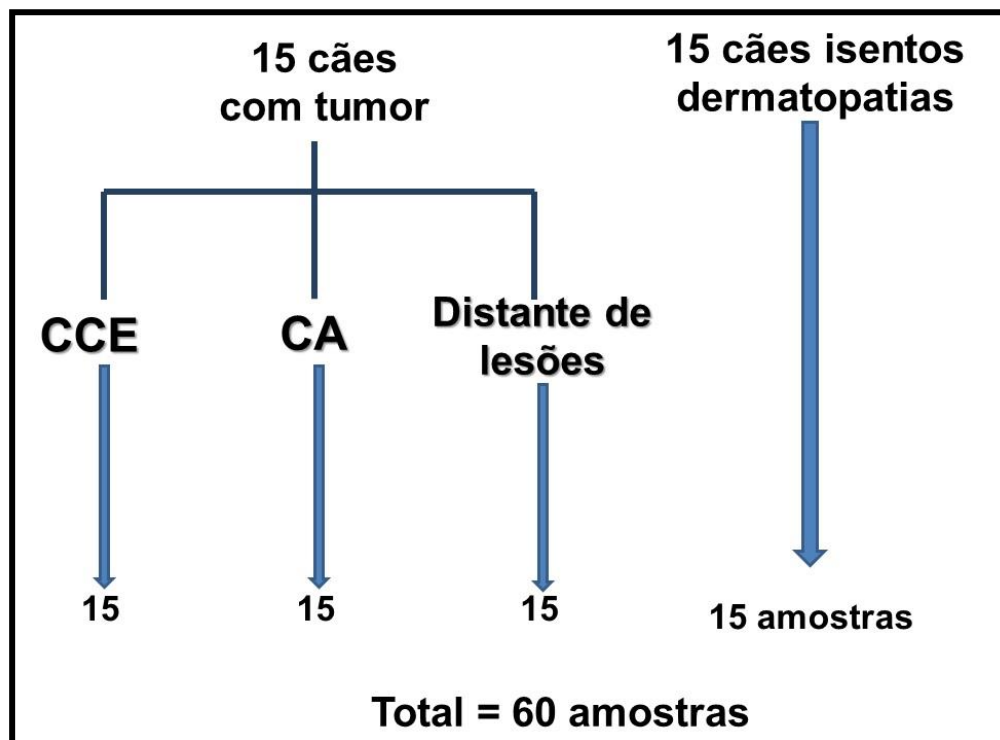


Figura 4. Ilustração demonstrativa da formação dos grupos experimentais.



#### 4.5. Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV/Unesp, câmpus de Jaboticabal, sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirela Tinucci Costa, e no Laboratório de Investigação Molecular do Câncer (LIMC), da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), sob a supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari.

Para a técnica de imuno-histoquímica, as amostras foram previamente montadas em lâminas específicas (Starfrost<sup>®</sup>, Knittel Glass, Alemanha). No momento da reação foram acondicionadas em estufa a 37°C por no mínimo 3 horas. A desparafinização e a reidratação foram feitas em baterias de xilóis e álcoois em concentrações decrescentes (Apêndice). Para o anticorpo monoclonal de camundongo anti-VEGF (Abcam<sup>®</sup>, ab1316) e o anticorpo policlonal de coelho anti-GLUT1 (Abcam<sup>®</sup>, ab652) utilizou-se o sistema de detecção livre de biotina (Spring<sup>®</sup>, catálogo SPB-999). Para recuperação antigênica, as lâminas receberam tratamento em banho-maria (98°C, por 30 minutos), em solução de citrato pH6. Após o resfriamento das mesmas, à temperatura ambiente, foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos. Adicionou-se, então, a cada lâmina solução de Protein Block (Spring<sup>®</sup>, DPB-125) para bloqueio de reações inespecíficas, por 10 minutos. A seguir foram adicionados os anticorpos primários anti-VEGF e anti-GLUT1, diluídos em tampão primário (Spring<sup>®</sup>, ADS-125) (Tabela 1). Em seguida, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C. Após esse período, adicionou-se o reagente complemento (Spring<sup>®</sup>, SPB-125) por 10 minutos e, após remoção do excesso, foi empregado o conjugado HPR (Spring<sup>®</sup>, SPB-125) por 15 minutos. A seguir, o cromógeno diaminobenzina 3,3 (DAB), diluído em DAB substrato (Spring<sup>®</sup>, DAB-125) foi adicionado, deixando-se agir por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram contra-coradas pela hematoxilina de Harris por 40 segundos e lavadas em água corrente. A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de álcoois e xilóis, seguidas pela montagem das lâminas com verniz e lamínulas.

Após cada um dos tratamentos recebidos, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2, excetuando-se a etapa entre o

reagente complemento e o reagente conjugado HPR, e sempre mantidas em câmara úmida e escura. Como controle negativo, os anticorpos foram substituídos por diluente tampão primário. E para controles positivos foram utilizados os tecidos de rim e cólon humano (Tabela 1), obtidos no próprio laboratório da FAMERP, respectivamente para os anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT 1.

As lâminas foram observadas em microscópio com objetiva de 40X, e então fotografadas. O percentual de positividade foi obtido por densitometria das áreas coradas das células imunorreativas com o auxílio de um equipamento analisador de imagens ImageJ (versão 1.47, National Institutes of Health, EUA). Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (UA) e a densidade óptica média demonstrou a intensidade de imunomarcção apenas nas áreas imunorreativas. Para tal, foram fotografadas 5 (cinco) áreas aleatórias da epiderme de cada lâmina. Em cada fotomicrografia, com o auxílio do programa ImageJ, foram selecionados 20 pontos para a análise da densitometria. Nas lâminas ensaiadas com o anticorpo anti-VEGF foram selecionados pontos do citoplasma, enquanto do anti-GLUT1 os pontos foram obtidos da membrana celular. De cada ponto o programa forneceu uma UA, sendo então, no total, 100 pontos por lâmina por anticorpo avaliado (Figura 5).

Tabela 1. Anticorpos primários, clones, tecidos controles e diluições utilizadas nas reações de imuno-histoquímica.

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Clones</b>	<b>Tecido controle</b>	<b>Diluição</b>
Anti-VEGF <sup>a</sup>	Monoclonal	rim humano*	1:1000
Anti-GLUT 1 <sup>b</sup>	Policlonal	cólon humano*	1:800

<sup>a</sup>- Abcam<sup>®</sup>, ab1316; <sup>b</sup>-Abcam<sup>®</sup>, ab652; \*Tecidos humanos, provenientes da Faculdade de Medicina de São José de Rio Preto (FAMERP) do Laboratório de Investigação Molecular do Câncer, sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari.

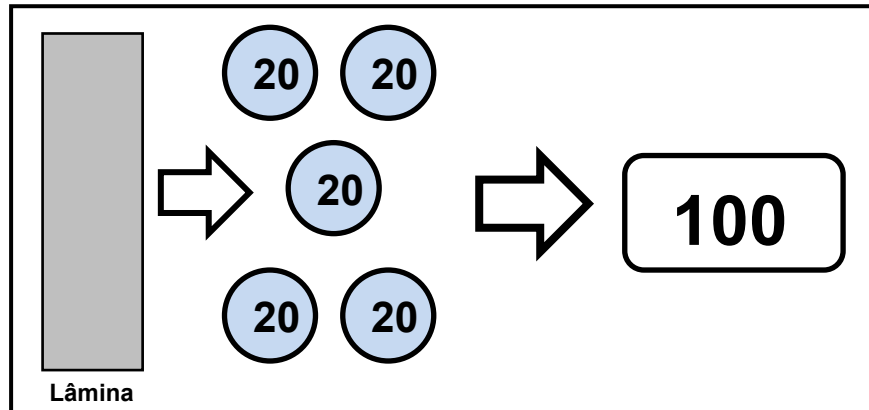


Figura 5. Ilustração demonstrativa da obtenção dos pontos de imunomarcção na análise densitométrica.

#### 4.6. Análises estatísticas

Os dados referentes ao estudo imuno-histoquímico foram avaliados entre o grupo Controle e os grupos CCE, CA e Distante de lesões (Bloco 1), e entre os grupos CCE, CA e Distante de lesões (Bloco 2), para a análise de variância e comparação das médias por meio do teste de Kruskal-Wallis. Também foram comparadas as variáveis imuno-histoquímicas entre os grupos que recebiam anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) sistêmicos e os que não os recebiam (Bloco 3), por meio do teste Mann-Whitney, assim como foram comparados os grupos com recidiva tumoral e que não apresentaram recidiva (Bloco 4), por meio do mesmo teste. Os resultados foram analisados com o programa Graph Pad Prism (versão 6.04, Graph Pad Software, Inc., EUA), sob supervisão do Prof. Dr. Gener Tadeu Pereira, Depto. de Ciências Exatas, FCAV/Unesp, câmpus Jaboticabal.

## 5. Resultados

### 5.1. Cães

Dos 15 cães com tumores cutâneos, as raças mais acometidas foram: 60% Pit Bull (n=9), 26,6% sem raça definida (n=4) e 13,3% Boxer (n=2). A média de idade e massa corporal foi de 8,6 anos (7 a 13 anos) e 31,9 kg (18 a 56 kg), respectivamente, sendo 53% machos (n=8).

Quanto à cor da pelagem, 66,6% (n=10) eram da cor branca, ou brancos malhados de caramelo; 26,6% (n=4) de pelagem marrom e abdômen e face medial dos membros pélvicos brancos e/ou glabros; 6,6% (n=1) pelagem marrom e o abdômen em tom mais claro. As lesões estavam assim distribuídas: 46,6% (n=7) na região do abdômen; 26,6% (n=4) em prepúcio e abdômen, 6,6% (n=1) abdômen e mama, 13,3% (n=2) abdômen e flanco, e 6,6% (n=1) na área medial do membro pélvico.

Para obtenção do diagnóstico histopatológico, em 13,3% (n=2) dos cães as biopsias foram incisionais, enquanto que em 86,6% (n=13) foram excisionais. Em três casos o linfonodo satélite foi removido, sendo em 1 (um) deles confirmada metástase e em dois não havia infiltração.

Durante o período do experimento, 33,3% (n=5) dos cães vieram a óbito por causas diversas, não relacionadas à neoplasia. Não foram realizadas necropsias nos mesmos por se encontrarem nos respectivos domicílios.

No momento da coleta das biopsias, 53,3% dos cães (n=8) recebiam anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) sistêmicos, desde o primeiro atendimento e, portanto, por tempo variado; quatro estavam sendo tratados com firocoxibe, três com meloxicam e um com piroxicam.

Durante o tempo de seguimento de cada um dos pacientes incluídos neste estudo, que foi de aproximadamente 720 dias, seis cães (40%) apresentaram recidiva local de CCE, mesmo após a instituição da terapia.

As modalidades terapêuticas foram exérese cirúrgica em 53,3% (n=8) dos casos, exérese cirúrgica mais quimioterapia sistêmica (carboplatina ou bleomicina mais doxorubicina) em 26,6% (n=4) e somente tratamento clínico (n=3) em 20%. Em todos os casos o tratamento clínico foi instituído após as coletas de amostras,

que consistia da utilização de protetor solar, administração de AINE e restrição à exposição ao sol.

## **5.2. Amostras**

### **5.2.1. Avaliação histopatológica**

Na avaliação microscópica dos tecidos avaliados, em cada grupo, pode-se observar um padrão histológico da epiderme e da derme. Amostras do grupo Controle apresentaram na epiderme de uma a três camadas celulares, organizadas e bem definidas, mantendo igual relação entre núcleo e citoplasma nas diversas células. A derme apresentava basicamente um tecido conjuntivo fibroso e denso (Figura 6-A).

As amostras do grupo Distante de lesões (Figura 6-B) apresentavam na epiderme de três a cinco camadas de células, em sua maioria, mantendo a arquitetura e a polaridade. A camada basal apresentava padrão linear, contudo com leves irregularidades, mas sem projeções à derme. Ortoceratose era evidente. As células mantiveram relação semelhante de citoplasma e núcleo entre si, contudo, havia hiperplasia. A derme apresentava tecido conjuntivo fibroso com maior espessura e menor densidade, comparado ao grupo Controle.

No grupo CA (Figura 6-C), em sua maioria as amostras apresentavam epiderme com cinco ou mais camadas de células com leve a moderada distorção da arquitetura e da polaridade; a camada basal apresentava-se com linearidade irregular, com projeções à derme ao longo da amostra, hiperplasia celular irregular, alta relação citoplasma:núcleo, comparado ao evidenciados nos grupos anteriores citados; evidente ortoceratose, paraceratose e maior atividade mitótica, além da camada de células basais. Poucas amostras apresentavam pérolas córneas. A derme apresentava tecido conjuntivo fibroso com fibras degeneradas e em desorganização, com proliferação de fibroblastos.

As amostras do grupo CCE apresentavam epiderme com mais de cinco camadas celulares, algumas chegando a 12 camadas, com marcada perda de arquitetura e polaridade. Apresentavam, também, hiperkeratose, hiperplasia, ortoceratose e proliferação de ceratinócitos neoplásicos, invadindo a derme em

projeções pela membrana basal ou através de ilhas de células epiteliais neoplásicas. Estavam também presentes alta relação citoplasma:núcleo, núcleos multilobulares e atividade mitótica moderada. Havia pérolas córneas em maior frequência. Na derme, visibilizou-se fibroplasia moderada a abundante, com fibras degeneradas e desorganizadas (Figuras 6-D).

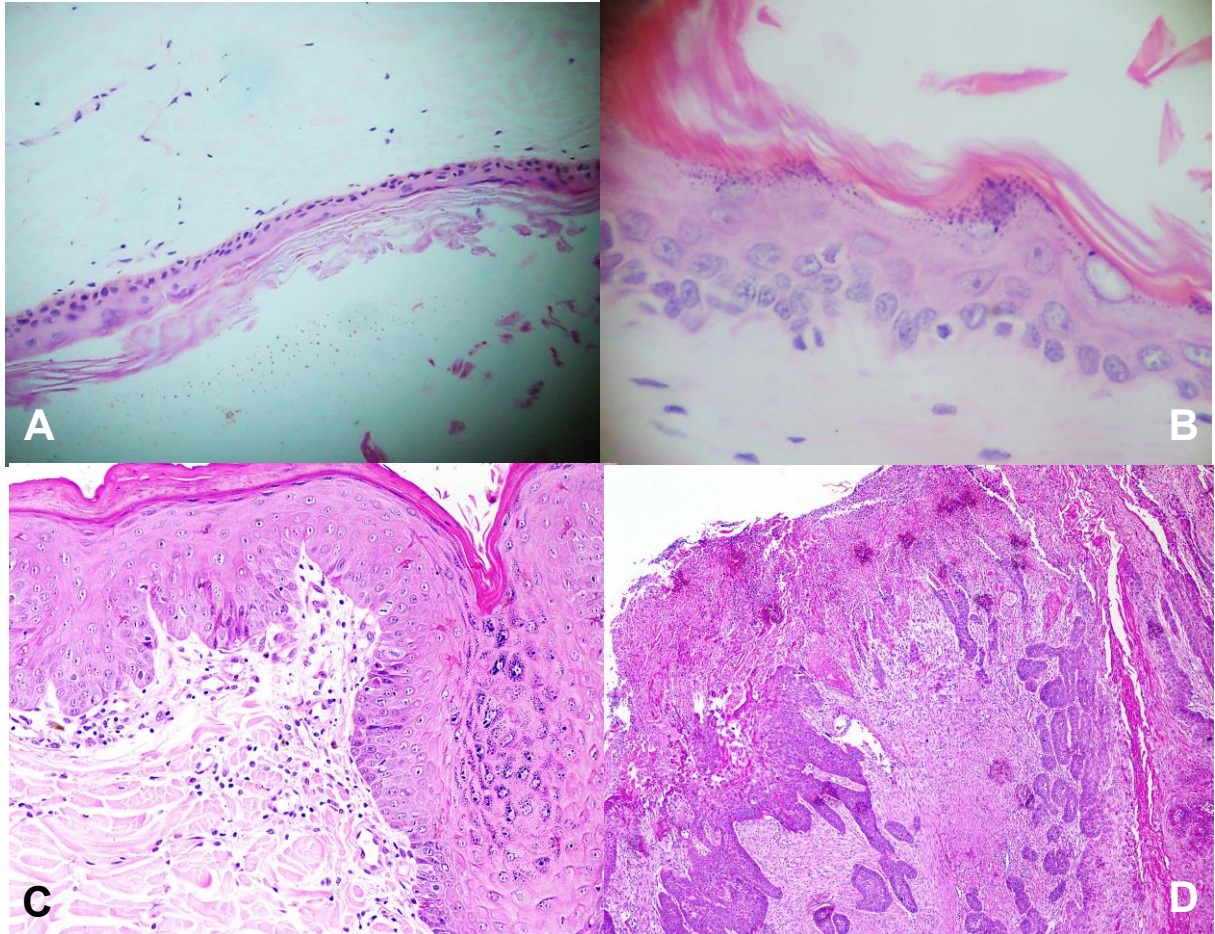


Figura 6. A. Fotomicrografia de pele de cão ausente de dermatopatia, do grupo Controle, demonstrando epiderme com três camadas de ceratinócitos e polarização das células (100x); B. Fotomicrografia de pele essencialmente normal, de cão com carcinoma de células escamosas, apresentando cinco camadas de ceratinócitos e leve irregularidade da linearidade da membrana basal (400X); C. Fotomicrografia de ceratose actínica de cão, mais de cinco camadas de ceratinócitos, irregularidade da linearidade da membrana basal e projeções da epiderme à derme (100X); D. Fotomicrografias de carcinoma de células escamosas cutâneo, em cão, apresentando perda da arquitetura da epiderme, projeções da epiderme à derme, ilhas de ceratinócitos e irregularidade da membrana basal (400X). Jaboticabal, 2014.

### **5.2.2. Imunomarcção pelo anticorpo anti-VEGF**

O anticorpo anti-VEGF apresentou imunomarcção forte nos citoplasmas das células nas amostras de CCE e CA, nas diferentes camadas da epiderme (Figura 7-A e B), o que foi confirmado nas avaliações imunodensitométricas. Nas amostras do grupo Distante de lesões, a imunomarcção restringiu-se às camadas mais externas da epiderme e com intensidade média de coloração (Figura 7-C). No grupo Controle a imunomarcção concentrou-se essencialmente na camada externa da epiderme e dispersa pelo citoplasma dos ceratinócitos (Figura 7-D). Interessante ressaltar que o padrão de coloração encontrado neste último grupo diferia dos registrados nas amostras de CCE, CA e na pele distante de lesões dos cães com tumor.

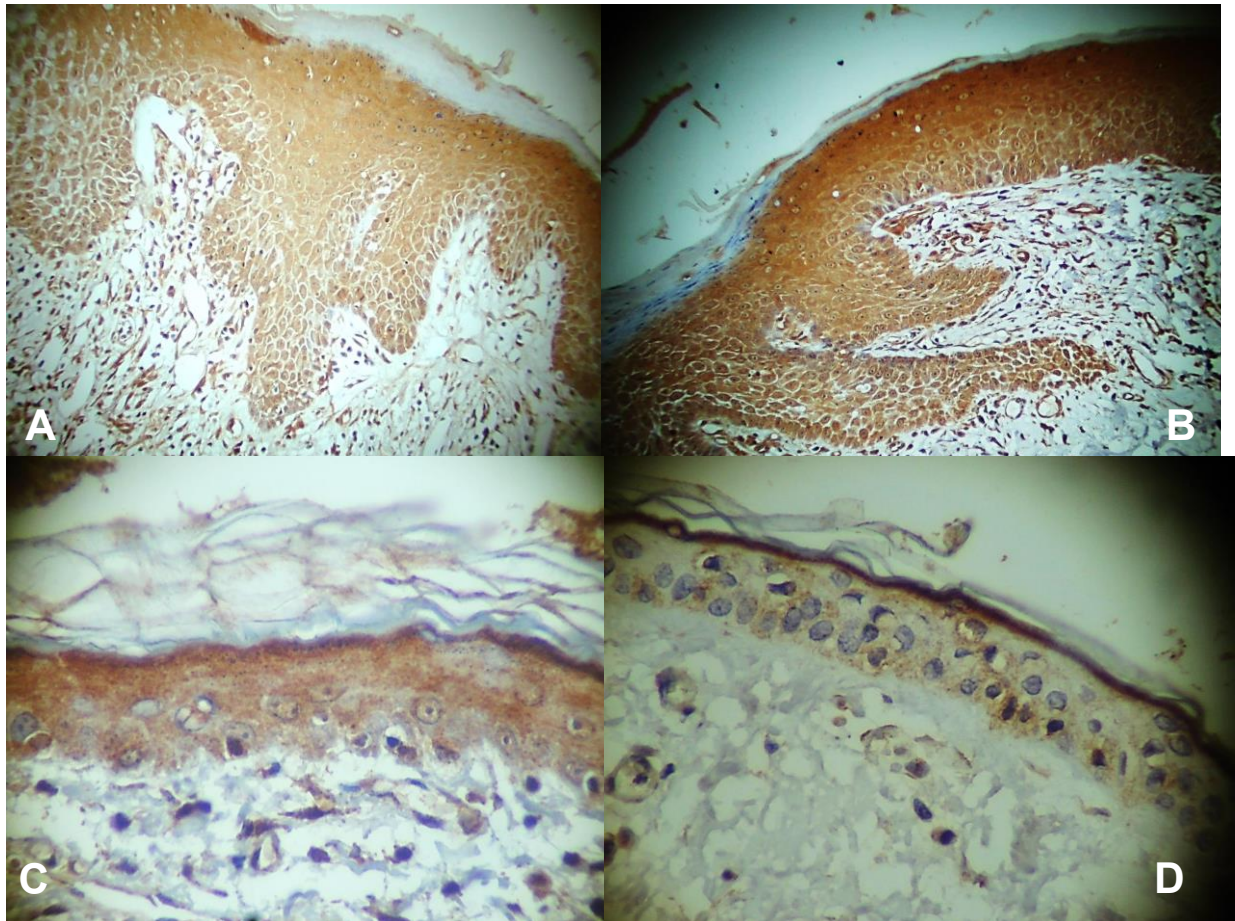


Figura 7. A. Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas cutâneo em cão mostrando os citoplasmas dos ceratinóticos imunomarcadas com o anticorpo anti-VEGF (100X); B. Fotomicrografia de ceratose actínica em cão mostrando os citoplasmas dos ceratinócitos, em todas as camadas da epiderme, imunomarcados com o anticorpo anti-VEGF (100X); C. Fotomicrografia de pele essencialmente normal de cão acometido com CCE cutâneo, mostrando que a imunomarcção com o anticorpo anti-VEGF se apresenta com maior intensidade na camada mais externa (400X); D. Fotomicrografia de pele normal, de cão ausente de dermatopatia, com intensidade do anticorpo anti-VEGF dispersa no citoplasma dos ceratinócitos (400X). Jaboticabal, 2014.



Na análise estatística (Tabela 2) observou-se que houve diferença significativa entre as intensidades de imunomarcacão do grupo Controle e os grupos Distante de lesões, CA e CCE, em relação à imunomarcacão densitométrica.

Tabela 2. Comparação estatística da imunomarcacão pelo anticorpo anti-VEGF, pelo teste de Kruskal-Wallis, do grupo Controle e dos grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.

<b>Grupo</b>	<b>Grupo</b>	<b>p*</b>
Controle	Distante de lesões	0,0004
Controle	CA	0,0177
Controle	CCE	<0,0001

\*p considerado significativo se <0,05.

Quanto à análise estatística entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE (Tabela 3) observaram-se diferença significativa entre as intensidades de imunomarcacão dos grupos Distante de lesões-CCE e CA-CCE; contudo não houve diferença na marcação imunodensitométrica entre os grupos Distante de lesões-CA.

Tabela 3. Comparação estatística da imunomarcacão pelo anticorpo anti-VEGF, pelo teste de Kruskal-Wallis, entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.

<b>Grupo</b>	<b>Grupo</b>	<b>p*</b>
Distante de lesões	CA	0,9553
Distante de lesões	CCE	<0,0001
CA	CCE	<0,0001

\*p considerado significativo se <0,05.

As médias da análise densitométrica de cada amostra para o anticorpo anti-VEGF estão representadas na Figura 8.

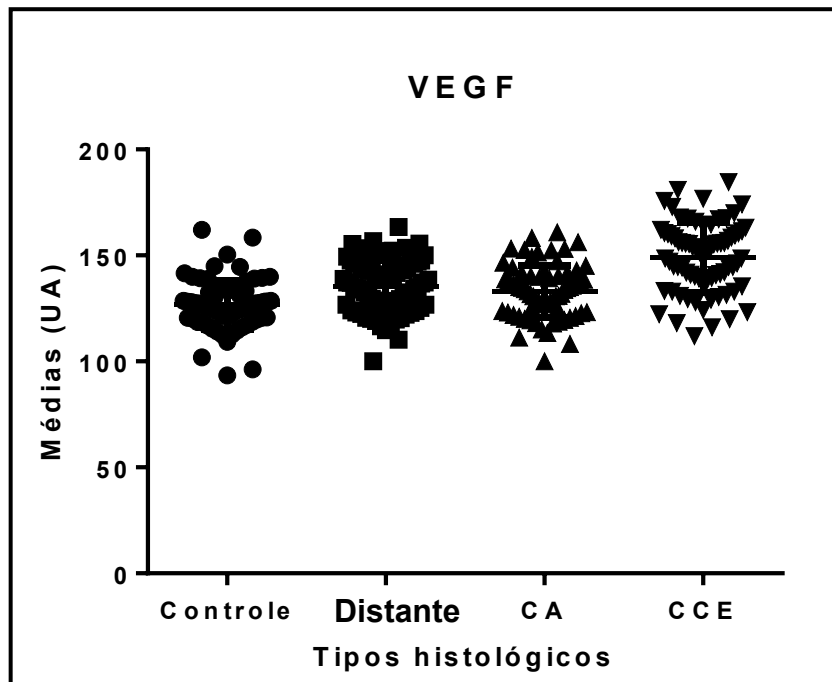


Figura 8. Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras dos grupos Controle, Distante de lesões, CA e CCE, para o anticorpo anti-VEGF, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.

### 5.2.3. Imunomarcção pelo anticorpo anti-GLUT1

O anticorpo anti-GLUT1 mostrou marcação na membrana dos ceratinócitos, com coloração intensa nas camadas mais internas da epiderme nos grupos CCE e CA e Distante de lesões. À medida que os ceratinócitos dos grupos CCE e CA se aproximavam da superfície da epiderme, a marcação tornava-se mais fraca (Figura 9-A e B). Na pele essencialmente normal destes mesmos animais a imunomarcção foi observada somente na camada basal da epiderme em sua totalidade (Figura 9-C). No grupo Controle a imunomarcção foi dispersa entre as membranas celulares das células da epiderme, sem que obedecesse a um padrão (Figura 9-D).

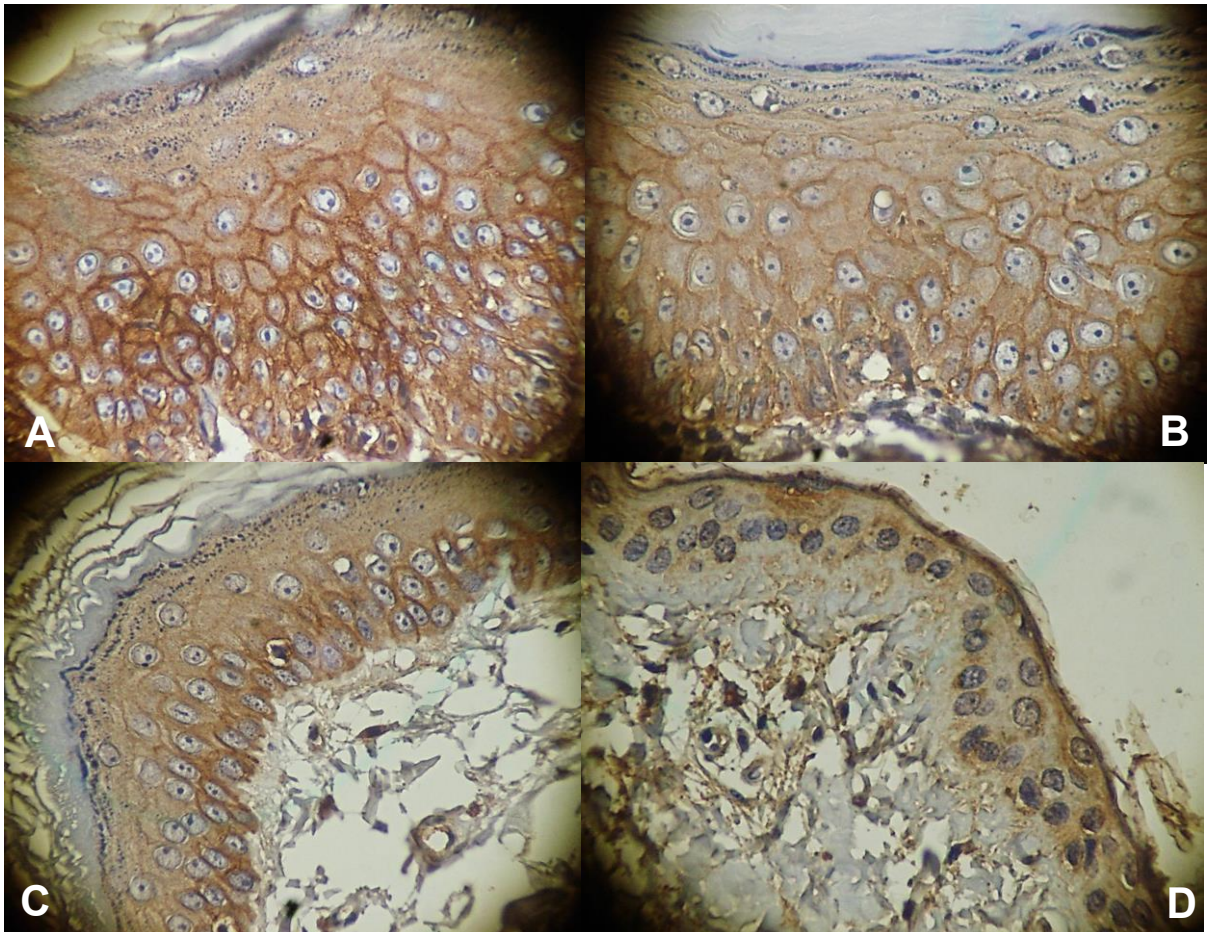


Figura 9. A. Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas cutâneo mostrando imunomarcção da membrana basal dos ceratinóticos por anticorpo anti-GLUT 1 (400X); B. Fotomicrografia de ceratose actínica de cão mostrando em todas as camadas as membranas celulares dos ceratinócitos imunomarcados com o anticorpo anti-GLUT 1 (400X); C. Fotomicrografia de pele essencialmente normal de cão com CCE, apresentando imunomarcção forte, pelo anticorpo anti-GLUT 1, principalmente na camada basal (400X); D. Fotomicrografia de pele normal de cão ausente de dermatopatia, apresentando a imunomarcção pelo anticorpo anti-GLUT 1, dispersa pelas membranas celulares dos ceratinócitos, sem que haja um padrão (400x). Jaboticabal, 2014.

A análise estatística das imunomarcações realizadas entre o grupo Controle e os grupos Distante de lesões, CA e CCE mostrou diferença significativa entre as intensidades de imunomarcação (Tabela 4) entre todos os grupos estudados.

Tabela 4. Comparação estatística da imunomarcação pelo anticorpo anti-GLUT 1, pelo teste de Kruskal-Wallis, entre o grupo Controle e os grupos Distante de lesões, CA e CCE. Jaboticabal, 2014.

<b>Grupo</b>	<b>Grupo</b>	<b><i>p</i>*</b>
Controle	Distante de lesões	<0,0001
Controle	CA	<0,0001
Controle	CCE	<0,0001

\**p* considerado significativo se <0,05.

O estudo estatístico realizado das imunomarcações entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE (Tabela 5) revelou diferença significativa nas intensidades de imunomarcação entre os grupos Distante de lesões-CA e Distante de lesões-CCE, contudo, não houve diferença entre o grupo CA-CCE.

Tabela 5. Comparação estatística pelo teste de Kruskal-Wallis entre os grupos Distante de lesões, CA e CCE da imunomarcação pelo anticorpo anti-GLUT1. Jaboticabal, 2014.

<b>Grupo</b>	<b>Grupo</b>	<b><i>p</i>*</b>
Distante de lesões	CA	0,0001
Distante de lesões	CCE	0,0004
CA	CCE	>0,9999

\**p* considerado significativo se <0,05.

As médias da análise densitométrica de cada amostra para o anticorpo anti-GLUT 1 estão representadas na Figura 10.

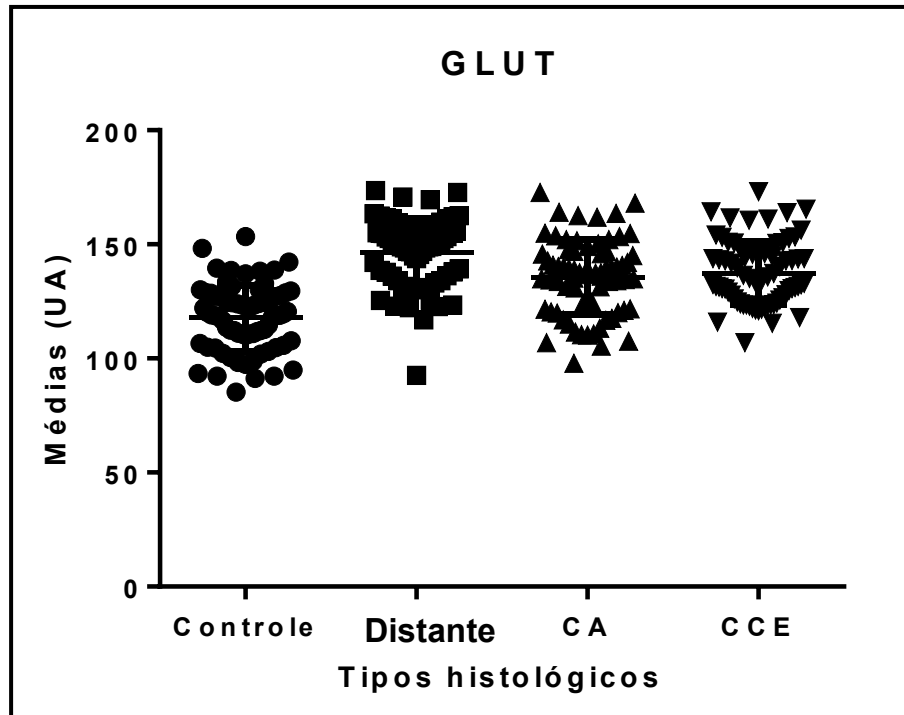


Figura 10. Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras dos grupos Controle, Distante de lesões, CA e CCE, para o anticorpo anti-GLUT 1, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.

#### 5.2.4. Comparação das imunomarcações dos anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT1 entre os grupos com e sem administração sistêmica de anti-inflamatório não esteroideal

Os 15 cães com CCE desse estudo foram divididos em dois grupos, a saber: os cães que receberam AINE sistêmico por pelo menos 15 dias (n=8) antes da realização da coleta de amostras, e os que não receberam AINE sistêmico (n=7).

Para isso, foram realizadas as análises da intensidade dos dois anticorpos e subdivididos os grupos em: grupo CCE AINE e grupo CCE sem AINE; grupo CA AINE e grupo CA sem AINE; e grupo Distante de lesões AINE e grupo Distante de lesões sem AINE.

A análise estatística mostrou diferença significativa ( $p=0,0003$ ) somente nos grupos CA, na imunomarcção com o anticorpo anti-VEGF (Figura 11), entre os cães que receberam AINE sistêmico e os que não receberam, sendo a maior intensidade no último grupo. As demais análises não foram significativas ( $p>0,05$ ).

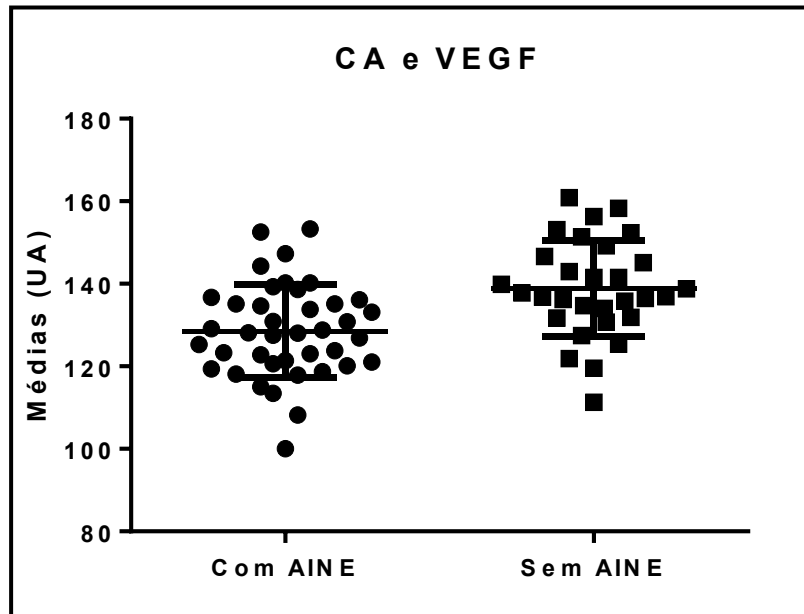


Figura 11. Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que receberam e não receberam AINE, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.

### 5.2.5. Comparação das imunomarcações anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre os grupos de cães com e sem recidiva tumoral local

Seis cães apresentaram recidiva tumoral local após a instituição dos tratamentos (três foram exérese cirúrgica e três exérese cirúrgica mais quimioterapia) e durante o acompanhamento; os nove restantes cães responderam adequadamente ao tratamento empregado (cinco foram exérese cirúrgica, um exérese cirúrgica mais quimioterapia sistêmica e um apenas o tratamento clínico).

Dos seis cães com recidiva cinco (83,3%) apresentavam CCE bem diferenciados e um (16,6%) CCE acantolítico; enquanto que os nove cães restantes apresentaram CCE bem diferenciados. Comparando-se as análises densitométricas para os anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT 1 nas amostras de pele dos cães com

recidiva aos demais que não a apresentaram, verificou-se que a intensidade do anti-VEGF, comparando os grupos CA (Figura 12) e CCE (Figura 13) com e sem recidiva, foi significativa ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0381$ , respectivamente), com maior intensidade nas amostras dos cães que manifestaram recidiva. Não se observou diferença significativa entre o grupo Distante de lesões para o anticorpo anti-VEGF e os demais grupos para o anticorpo anti-GLUT1.

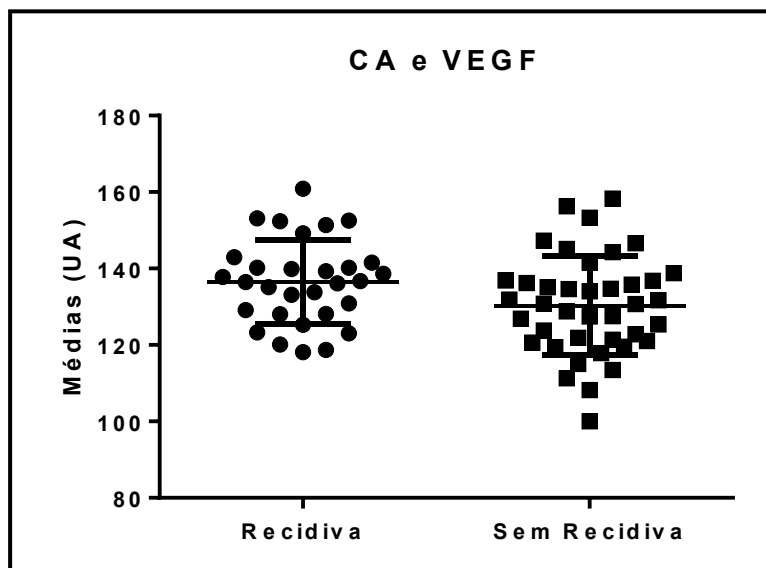


Figura 12. Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que apresentaram e não apresentaram recidiva do tumor, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.

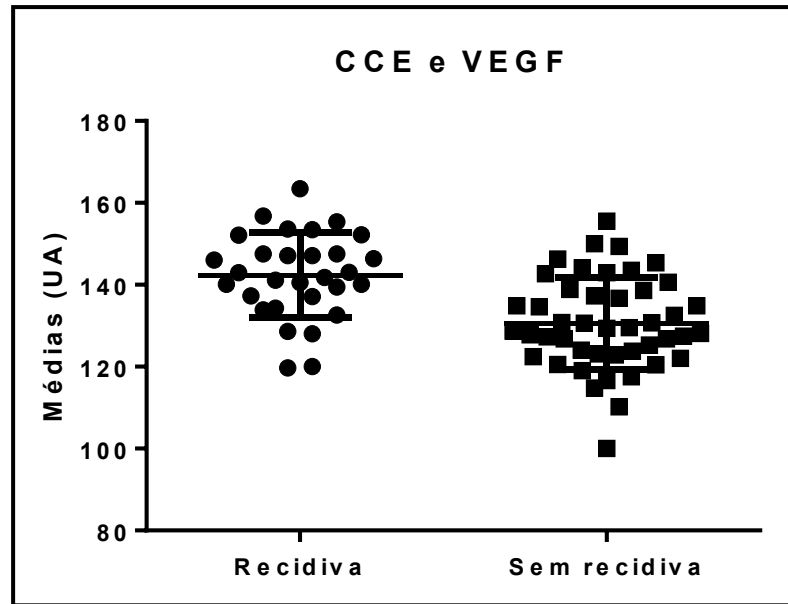


Figura 13. Representação gráfica dos valores das médias das unidades arbitrárias, por densitometria, nas amostras com CA avaliadas com o anticorpo anti-VEGF, divididas em cães que apresentaram e não apresentaram recidiva do tumor, em gráfico de dispersão de pontos. Jaboticabal, 2014.



## 6. Discussão

### 6.1. Cães

Observou-se neste estudo que as raças mais frequentes acometidas com CCE foram Pitt Bull, Boxer e cães sem raça definida. Destaca-se que a casuística do Hospital Veterinário, onde os cães foram selecionados, é bastante variada, sendo que há um grande número de cães sem definição racial atendidos diariamente, devido às mais variadas queixas clínicas. Somado ao número expressivo de cães Pitt Bull atendido em nosso hospital-escola, estes eram, em sua maioria, de pelagem clara ou marrom e desprovida de pigmentação nas áreas acometidas, fatos que os fazem grandes candidatos ao desenvolvimento de CCE. Poggiani et al. (2012), no mesmo hospital escola, também observaram que o Pitt Bull se destacava como a raça mais frequente em ocorrência de CA e CCE. Quanto à raça Boxer, há descrição na literatura mundial de predisposição racial ao desenvolvimento de CCE, similar a este estudo, e também ao exposto por Thomas e Fox (1998), Scott et al. (2001) e João (2008).

Similarmente, a média das idades dos cães acometidos foi de 8,6 anos no estudo em tela, o que demonstra que tanto a CA, quanto o CCE costumam se manifestar em cães adultos a idosos (GROSS et al., 2009).

Não foi observada diferença entre a frequência de cães machos e fêmeas acometida por CA/CCE neste estudo, aos moldes do que foi observado por João (2008) e Poggiani et al. (2012) em estudos com populações caninas semelhantes, e do que é observado na literatura mundial (SCOTT et al., 2001; MEDLEAU; HNILICA, 2006; GROSS et al., 2009).

O peso médio (31,9 kg) expõe que os cães acometidos por CA/CCE selecionados para este estudo eram de porte médio ou grande. Em geral, tradicionalmente na região em que o Hospital Veterinário de Jaboticabal está localizado, é comum que cães médios ou grandes sejam criados em locais abertos, o que aumenta a chance de exposição solar demasiada. Destaca-se, ainda, que o índice de raios ultravioletas nesta região geográfica é, na maior parte do ano, alto (SANTOS; ANDRE; VOLPE, 1983).

No que concerne ao papel de defesa da pele como barreira cutânea, sabe-se que os pelos atuam como fotoprotetor e que a habilidade destes em proteger a pele se baseia em sua espessura, comprimento, cor e densidade local. Ademais, a melanina é responsável pela pigmentação do pelame e da pele, além de atuar como uma barreira contra a radiação ionizante e ser importante na proteção contra a radiação UV, comportar-se como um removedor de radicais citotóxicos e participa nos processos inflamatórios locais (SCOTT et al., 2001). Adicionalmente, Gross et al. (2009) apontam que cães de pelame curto e manto piloso ventral branco ou malhado são predispostos ao desenvolvimento de CA/CCE. No estudo em tela, todos os cães selecionados eram de pelame claro, variando de branco a marrom ou malhado, e todos apresentavam flanco, abdômen e membros glabros ou com densidade pilosa reduzida, o que corrobora o exposto na literatura.

Apesar do prognóstico do CCE ser variável, o óbito é infreqüentemente relatado, embora possa ocorrer por complicações da evolução do CCE, tais como hemorragia grave, sepse e metástases locais ou à distância que, por sua vez, raramente ocorrem. Neste estudo, apontamos a dificuldade em afirmar que o óbito registrado em 33,3% dos casos tivesse alguma relação com o CCE. Como mencionado anteriormente, não foi possível a avaliação *post-mortem* destes cães.

Dos 15 cães selecionados, apenas em três o linfonodo inguinal superficial foi removido no mesmo tempo cirúrgico e, destes, houve a identificação de metástase regional em um cão acometido por CCE, na avaliação histopatológica. A remoção do linfonodo satélite foi recomendada nestes três casos, uma vez que o aumento desta estrutura foi reconhecido pela palpação ao exame físico pré-operatório nestes pacientes. No que concerne à ocorrência de metástase para linfonodos regionais no CCE cutâneo canino, há escassos dados na literatura consultada. Há taxas descritas na literatura de 4% a 37% de metástases para linfonodos regionais no CCE facial humano (WERMKER et al., 2014), e em doze cães diagnosticados com CCE oral papilares, nenhum apresentou metástase (NEMEC et al., 2014). Deste modo, consideramos importante a avaliação histopatológica e/ou a imunomarcagem dos linfonodos satélites nos casos de CCE cutâneos em cães, a fim de estabelecer o prognóstico e a condução terapêutica adequadas para cada caso.

A recidiva tumoral local foi relatada em 70% (7/10) dos cães no estudo de Poggiani et al. (2012) em até 25 meses de acompanhamento, e 40% (6/15) neste estudo, em até 24 meses de acompanhamento. Lascelles et al. (2000) ao acompanharem 17 cães com diagnóstico de CCE no plano nasal, 14 apresentaram recidiva mesmo submetidos a diferentes tratamentos; e de oito cães tratados com radioterapia quatro apresentaram recidiva (ROGERS; HELMAN; WALKER, 1995). As discordâncias observadas entre os estudos poderiam estar relacionadas, ao menos em parte, às terapias optadas em cada caso de CCE, pois não há uma padronização terapêutica.

## **6.2. Avaliação histopatológica das amostras**

Inicialmente foram observadas diferenças morfológicas entre os tecidos dos grupos Controle e Distante de lesões. Observou-se que no grupo Distante de lesões já se identificava alterações quanto ao número de camadas e a presença de ortoceratose, por exemplo, quando comparado às amostras do grupo Controle, que eram advindas de cães sem comprometimentos dermatológicos de qualquer gênero. Diante do exposto, podemos sugerir que há algum grau de alteração morfo-fisiológica na pele considerada normal de cães com CA/CCE, o que pode estar relacionado ao estresse que esta região da pele recebeu com os raios UV. Há a necessidade de estudos com correlação clínica e histopatológica, e de graduação de tipos histológicos de peles de cães saudáveis e com algum grau de lesão por raios UV, para melhor definir prognóstico e conduta terapêutica.

## **6.3. Imunomarcação pelo anti-VEGF**

O VEGF é uma proteína expressa no citoplasma dos ceratinócitos, sendo considerado o principal promotor da angiogênese e de estimular a proliferação tecidual, auxiliando no aumento do aporte vascular às células tumorais centrais e progressão do câncer (NEUFELD et al., 1990; BOWDEN et al., 2002). O VEGF é considerado um marcador de prognóstico no CCE (RESTUCCI et al., 2002), e pode ser quantificado por imuno-histoquímica para avaliar a agressividade do mesmo. Pesquisadores demonstraram maior intensidade do VEGF no CCE, um tumor

maligno, comparado a um tumor benigno, o tumor de células basais (JOAO, 2008; MAIOLINO; VICO; RESTUCCI, 2000).

O presente estudo teve o intuito de avaliar se o VEGF poderia estar expresso de modo semelhante na pele de cão acometido ao mesmo tempo por CCE, CA e com pele Distante de lesões, como sugerido por Poggiani et al. (2012). Estes pesquisadores acompanharam que a expressão do COX-2, um dos marcadores de inflamação e progressão tumoral, estava expresso de forma semelhante na CA e no CCE, contudo esse estudo foi conduzido em grupos experimentais formados com amostras de CA e CCE coletadas não de um mesmo cão, diferente do nosso estudo em tela.

No estudo em discussão, a intensidade do VEGF nos tecidos do grupo Controle foi diferente dos tecidos dos cães com tumores, incluindo os tecidos com diagnóstico de ausência de lesão (grupo Distante de lesões), como era esperado. Ao se avaliar comparativamente os grupos CCE, CA e Distante de lesões, houve diferença significativa na intensidade do VEGF entre os grupos CA e CCE e grupos Distante de lesões e CCE, sendo o CCE o qual expressou maiores valores por avaliação densitométrica. Contudo, ao se comparar os grupos Distante de lesões e CA, a intensidade do anticorpo foi semelhante pela densitometria. Portanto, diante desses resultados a intensidade do VEGF e da avaliação por histopatologia na pele normal, sugere-se que nos cães acometidos por CA/CCE, a pele distante de lesões já apresente alterações fisiológicas, indicando que devam receber tratamento tópico associado ao sistêmico, objetivando controle da progressão das lesões, além restringir exposição aos raios UV. Sendo assim, o uso de crioterapia e/ou aplicação de fotoprotetores nas lesões, não garantem o controle da inflamação que já se evidencia nos tecidos normais desses cães.

Ressalta-se que alguns autores consideram a CA uma lesão pré-neoplásica ou o estágio inicial da CCE (ORTONNE, 2002; LEBWOHL, 2003; RÖWERT-HUBER et al., 2007; POGGIANI et al., 2012). Sendo o VEGF considerado um fator prognóstico e de semelhante intensidade em tecidos normais e com CA, segundo o presente estudo, deve se dedicar maior atenção aos tratamentos sistêmicos e ao acompanhamento em longo prazo nos cães com CCE, uma vez que alguns dos tecidos do grupo Distante de lesões foram coletados em regiões com maior

densidade de pelos, do que onde havia o CCE e a CA, e distantes do local de concentração das lesões mais evoluídas. Adicionalmente, sugere-se que estudos relacionados ao aparecimento de lesões cutâneas em cães submetidos a tratamento tópico para CA devam ser realizados.

#### **6.4. Imunomarcção pelo anti-GLUT 1**

A proteína GLUT 1 é expressa na membrana celular dos ceratinócitos e está relacionada ao maior incremento calórico à célula tumoral, necessário para a sobrevivência e proliferação celular (AIRLEY; MONBASHERI, 2007; FREEMAN et al., 2010).

Em alguns trabalhos em humanos, a quantificação do GLUT 1 pode ser considerada com uma ferramenta para identificação de lesões pré-neoplásicas em CCE de cabeça e pescoço (MELLANEN et al., 1994; REISSER et al., 1999). Um estudo em cão quantificou a expressão dessa proteína em tumores mamários (ALÒ et al., 2001), afirmando haver maior expressão do GLUT 1 nos tumores considerados malignos e podendo ser considerado um marcador prognóstico.

Este é o primeiro trabalho que avalia a intensidade do GLUT 1 em amostras de CCE cutâneo canino, bem como em CA. Nesse estudo foram encontradas, assim como o observado com o VEGF, diferentes intensidades do GLUT 1 nos grupos CCE, CA e Distante de lesões em relação ao grupo Controle, como esperado, demonstrando que há um aumento da intensidade desta proteína nos tecidos em processo inflamatório e em proliferação.

Quando avaliado os grupos Distante de lesões, CA e CCE, a intensidade do GLUT 1 diferiu significativamente nos tecidos normais comparados à CA e ao CCE, contudo não diferiu entre os tecidos CA e CCE, o que demonstra um mesmo comportamento da intensidade da proteína do GLUT 1 nestas distintas lesões.

Pode-se sugerir, diante desses dados, que CA é uma lesão pré-neoplásica e necessita de atenção e cuidados semelhantes ao CCE, no que concerne ao prognóstico e condução terapêutica. Todavia, estudos mais específicos relacionados aos tratamentos, acompanhamento e avaliação imuno-histoquímica são necessários para melhor definir o prognóstico e optar pelo tratamento mais adequado para cada caso. Sugere-se, diante destes resultados, que a conduta terapêutica local para CA

e CCE seja semelhante, como a excisão cirúrgica e, adicionalmente, que tratamentos sistêmicos sejam optados aos cães que apresentem as duas lesões concomitantemente.

#### **6.5. Comparação das imunomarcações com os anticorpos anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre os grupos com e sem administração sistêmica de anti-inflamatório não esteroide**

Os pacientes deste estudo foram subdivididos em dois grupos: grupo de cães que receberam AINE (firocoxibe, piroxicam ou meloxicam) sistemicamente por, no mínimo, 15 dias antes da realização da biopsia, e um grupo de cães que não receberam qualquer tipo de AINE sistêmico. Interessante que se observou diferença somente nos tecidos com CA, que tem maior intensidade do VEGF nos cães que não receberam AINE, comparado aos cães que receberam. As demais relações entre outros tecidos e intensidade de GLUT 1 não revelaram diferença.

Fatores inflamatórios auxiliam na progressão tumoral e a COX-2 é uma das proteínas relacionadas, de modo que sua inibição pode ter valor terapêutico nestes casos (KYZAS; STEFANO; AGNANTIS, 2005). Os AINEs têm atuação inibitória sobre a COX, com isso, suspeita-se retardar a progressão (SCHMIDT et al., 2001; BORJA et al., 2004). Alguns estudos revelaram a implicação da COX-2 na carcinogênese do epitélio escamoso e elucidaram a contribuição desta enzima para o crescimento e a progressão do CCE de cabeça e de pescoço em humanos (GALLO et al., 2001; KYZAS et al., 2005), e na CA/CCE canina (POGGIANI et al., 2012), por diferentes vias. O papel da COX-2, especificamente, é mediado por diferentes moléculas, dentre elas, o VEGF, que resulta na indução da angiogênese tumoral, invasão neoplásica e no aumento da proliferação celular (DOHADWALA et al., 2001). Deste modo, há pesquisas que determinaram correlação positiva entre a intensidade do VEGF e da COX-2 no adenocarcinoma pulmonar (SU et al., 2004) e no CCE de cabeça e pescoço humano (KYZAS; STEFANO; AGNANTIS, 2005), que também correlacionaram a elevada intensidade do VEGF e da COX-2 com a ocorrência de metástase em linfonodo regional. Adicionalmente, Rathore, Alexander e Cakanova (2014) demonstraram que a utilização de piroxicam juntamente ao Masitinib foi eficaz na inibição do CCE oral de cães e de humanos *in vitro*; enquanto

Boriaet al. (2004) associaram cisplatina e piroxicam no tratamento de CCE oral obtendo remissão do tumor em 55,5% dos cães.

Embora não se tenha trabalhado com a intensidade da COX no presente estudo, acredita-se que a maior intensidade do VEGF nas lesões de CA dos cães que não receberam AINE aponte para o que os demais estudos relacionados concluem, pois o uso de inibidores da COX também exerce efeitos indiretos sobre a angiogênese tumoral. Outro ponto interessante pode indicar que o uso de AINE na CA pode retardar a progressão para o CCE, ao também reduzir a intensidade do VEGF e, portanto, controlar o processo de angiogênese tumoral.

#### **6.6. Comparação das imunomarcações anti-VEGF e anti-GLUT 1 entre os grupos com e sem recidiva tumoral local**

Outra análise realizada entre os cães deste estudo foi separá-los em dois grupos quanto à ocorrência de recidiva tumoral local: grupo dos cães que apresentaram recidivas e grupo dos que não a apresentaram durante o tempo de acompanhamento de 24 meses. As amostras dos pacientes que apresentaram recidivas revelaram maior intensidade do VEGF tanto nos CCE quanto nas CA, comparados aos que não a tiveram. Nos tecidos normais analisados com anti-VEGF e nos tecidos analisados com anti-GLUT 1 não se obtiveram diferenças entre as expressões, sendo semelhantes entre si. Assim, sugere-se que o VEGF pode ser uma ferramenta a ser utilizada como marcador prognóstico mais sensível do que o GLUT 1 diante destes achados, no que se refere à gravidade do quadro e na possibilidade de evolução ou progressão do quadro clínico, apesar do tratamento empregado.

## 7. Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo, nas condições em que foi conduzido, permitiram concluir que:

- Cães da raça Pit Bull expostos a alta intensidade de radiação solar, como ocorre nesta região do Estado de São Paulo, são os mais predispostos a desenvolver o CCE e a CA concomitantemente.
- Os cães adultos a idosos, de pelame branco ou claro e de grande porte são os mais acometidos por CCE e CA.
- As peles aparentemente normais de cães que apresentam CA e CCE concomitantes já demonstram alteração morfo-fisiológica comparadas às peles de cães isentos de dermatopatias.
- A intensidade de marcação do VEGF teve comportamento semelhante em peles aparentemente normais e em CA de cães com CCE.
- A intensidade de marcação do GLUT 1 comportou-se de forma semelhante nas peles com CA e com CCE dos cães.
- A administração sistêmica de AINEs reduz a intensidade de marcação do VEGF na CA.
- O VEGF foi o melhor marcador de prognóstico, comparado ao GLUT 1, no que concerne a ocorrência de recidiva local tumoral.



## 6. Referências<sup>1</sup>

AIRLEY, R.E.; MOBASHERI, A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: Novel pathways and targets for anticancer therapeutics. **Journal of Chemotherapy**, Philadelphia, v. 53, p. 233–256, 2007.

ALMEIDA, E. M. P.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Thousand Oak, v. 49, n. 7, p. 867-875, 2001.

ALÒ, P. L.; VISCA, P.; BOTTI, C.; GALATI, G. M.; SEBASTIANI, V.; ANDREANO, T.; DI TONDO, U.; PIZER, E. S. Immunohistochemical expression of human erythrocyte glucose transporter and fatty acid synthase in infiltrating breast carcinomas and adjacent typical/atypical hyperplastic or normal breast tissue. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 116, p. 129–134, 2001.

AUGUSTE, P.; LEMIERE, S.; LARRIEU-LAHARGUE, F.; BIKFALVI, A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. **Critical Review in Oncology / Hematology**, Philadelphia, v. 1, n. 54, p. 53–61, 2005.

BACHA, W.J.; WOOD, L.M. In: \_\_\_\_\_. **Color atlas of veterinary histology**. Lea and Febiger: Philadelphia. P.269, 1990.

BANKS, W.J. In: \_\_\_\_\_. **Histologia Veterinária Aplicada**. Ed.2, São Paulo: Manole, p.629, 1992.

BEHROOZ, A.; ISMAIL-BEIGI, F. Dual control of glut1 glucose transporter gene expression by hypoxia and by inhibition of oxidative phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, p. 5555-5562, 1997.

<sup>1</sup> Segundo 6023/2002 (ABNT)

BERMAN, B.; BIENSTOCK, L.; KURITZKY, L.; MAYEAUX, E. J.; TYRING, S. K. Actinic keratoses: sequelae and treatments. **The Journal of Family Practice**, Parsippany v. 55, suppl., p. 1-8, 2006.

BORIA, P.A.; MURRY, D.J.; BENNETT, P.F.; GLICKMAN, N.W.; SNYDER, P.W.; MERKEL, B.L.; SCHLITTLER, D.L.; MUTSAERS, A.J.; THOMAS, R.M.; KNAPP, D.W. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam, for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs, **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, n.3, p.388-394, 2004.

BOWDEN, J.; BRENNAN, P.; UMAR, T.; CRONIN, A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Cutaneous Pathology**, San Francisco, n. 29, p.585-589, 2002.

BRAHIMI-HORN, M. C.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation. **Essays in Biochemistry**, London, v. 43, p. 165-178, 2007.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, New York, v. 6, n. 9, p. 653–960, 2003.

COCKERELL, C. J. Pathology and pathobiology of the actinic (solar) keratosis. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.149, suppl. 66, p.34-36, 2003.

CRESSEY, R.; WATTANANUPONG, O.; LERTPRASERTSUKE, N.; VINITKETKUMNUEN, U. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumorigenesis. **BMC Cancer**, London, v. 5, p. 128, 2005.

DAMERT, A.; IKEDA, E.; RISAU, W. Activator protein I binding potentiates the hypoxia-inducible factor I-mediated, hypoxia-induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor expression in C6 glioma cells. **Biochemical Journal**, London v. 327, p. 419-423, 1997.

DVORAK, H. F.; BROWN, L. F.; DCTMAR, M.; DVORAK, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 146, p. 1029–1039, 1995.

DOHADWALA, M.; LUO, J.; ZHU, L.; LIN, Y.; DOUGHERTY, G. J.; SHARMA, S.; HUANG, M.; POLD, M.; BATRA, R. K.; DUBINETT, S. M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 276, p. 20809–20812, 2001.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, New York, v. 6, n. 9, p. 669-676, 2003.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 285, p. 1182-1186, 1971.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford, v. 82, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 267, p. 10931–10934, 1992.

FORSYTHE, J. A.; JIANG, B. H.; IYER, N. V.; AGANI, F.; LEUNG, S. W.; KOOS, R. D.; SEMENZA, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 16, p. 4604-4613, 1996.

FREEMAN, A.; HETZEL, U.; CRIPPS, P.; MOBASHERI, A. Expression of the plasma membrane markers aquaporin 1 (AQP1), glucose transporter 1 (GLUT1) and Na, K-ATPase in canine mammary glands and mammary tumours. **The Veterinary Journal**, Philadelphia, v. 185, p. 90–93, 2010.

GALLO, O.; FRANCHI, A.; MAGNELLI, L.; SARDI, I.; VANNACCI, A.; BODDIT, V.; CHIARUGI, V.; MASINI, E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer: implications for tumor angiogenesis and metastases. **Neoplasia**, Philadelphia, v. 3, p. 53–61, 2001.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. In: \_\_\_\_\_. **Doenças da pele do cão e do gato: diagnóstico clínico e histopatológico**. São Paulo: Roca, 2009.

HARGIS, A. M.; THOMASSEN, R. W.; PHEMISTER, R. D. Chronic dermatosis and cutaneous squamous cell carcinoma in the beagle dog. **Veterinary Pathology**, London, v. 14, n. 3, p. 218-228, 1977.

HOCKEL, M.; SCHLONGER, K.; ARAL, B.; MILZE, M.; SCHAFFER, U.; VAUPEL, P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 56, p. 4509-4515, 1996.

HURWITZ, R.M.; MONGER, L.E. Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma. Benign or malignant? **Dermatologic Surgery**, Oxford, v.21, p.184, 1995.

JOÃO, C. F. **Expressão da E-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais em cães**. 2008. 42 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

JOÃO, C. F.; TINUCCI-COSTA, M.; CARDILLI, D. J.; FARIA, J. L. M.; 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**, Santa Maria, v. 41, n. 9, p. 1611-1616, 2011.

JOHNSTONE, S.; LOGAN, R. M. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Philadelphia v. 42, p. 337–342, 2006.

KYZAS, P. A.; STEFANO, D.; AGNANTIS, N. J. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Modern Pathology**, London, v. 18, p. 153-160, 2005.

KRISTENSEN, S. A study of skin diseases in dogs and cats. I. Histology of the hair skin of dogs and cats. **Nordisk Veterinaermedicin**, Berlin, n.27, p.593-603, 1975.

KUNKEL, M.; REICHERT, T. E.; BENZ, P.; LEHR, H. A.; JEONG, J. H.; WIEAND, S.; BARTENSTEIN, P.; WAGNER, W.; WHITESIDE, T. L. Over-expression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, Oxford, v. 97, p. 1015-1024, 2003.

LAISCELLES, B.D.X.; PARRY, A.T.; STIDWORTHY, M.F.; DOBSON, J.M>; WHITE, R.A.S. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. **Veterinary Research**, London, n.147, p.473-476, 2000.

LEBWOHL, M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v.149, suppl.66, p.31-33, 2003.

MAIOLINO, P.; VICO, G.; RESTUCCI, B. Expression of vascular endothelial growth factor basal cell tumors and in squamous cell carcinomas of canine skin. **Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v.123, p.141-145, 2000.

MCCALL, C.A.; COHEN, J.J. Programmed cell death in terminally differentiating keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, New York, n.97, p.111-114, 1991.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K. Squamous cell carcinoma. In: \_\_\_\_\_. **Small animal dermatology**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 395-398.

MELLANEN, P.; MINN, H.; GRENNAN, R.; HARKONEN, P. Expression of glucose transporters in head a neck tumors. **International Journal of Cancer**, Hoboken, v. 56, p. 622-629, 1994.

MITTELBRONN, M.A.; MULLINS, D.L.; RAMOS-CARO, F.A.; FLOWERS, F.P. Frequency of preexisting actinic keratosis in cutaneous squamous cell carcinoma. **International Journal of Dermatology**, Oxford, v.37, p.677-681, 1998.

MONTEIRO-RIVIERE, N.A.; STINSON, A.W.; CALHOUN, H.L. Integument. In: Dieter-Dellmann H., **Textbook of Veterinary Histology**, ed.4, Philadelphia: Lea and Febiger, p.285-312, 1993.

MORTIER, L.; MARCHETTIA, P.; DELAPORTE, E.; LASSALLEC, E. M.; THOMAS, P.; PIETTE, F.; FORMSTECHE, P.; POLAKOWSKAA, R.; DANZÉA, P. M. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16INK4a tumor suppressor. **Cancer Letters**, Oxford, v. 176, p. 205-214, 2002.

MOSCATELLI, D.; GROSS, J.; RIFKIN, D. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 91, p. 120, 1981.

NEMEC, A.; MURPHY, B. G.; JORDAN, R. C.; KASS, P. H.; VERSTRAETE, F. J. M. Oral Papillary Squamous Cell Carcinoma in Twelve Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v. 150, p. 155-161, 2014.

NEUFELD, G.; COHEN, T.; GENGRINOVITCH, S.; POLTORAK, Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 1, n. 13, p. 9-22, 1999.

OBERMAIR, A.; KOHLBERGER, P.; BANCHER, T. D.; TEMPFCR, C.; SLIULZ, G.; LEODOLTER, S.; REINTHALLER, A.; KAINZ, C. BREITENECKER, G.; GITSCH, G. Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. **Gynecologic Oncology**, Philadelphia v. 63, p. 204-209, 1996.

ORTONNE, J. P. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, Oxford v. 146, n. 61, p.20-23, 2002.

PLATT, S. R.; SCASE, T. J.; ADAMS, V.; WIECZOREK, L.; MILLER, J.; ADAMO, F.; LONG, S. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Oxford, v. 20, p. 663-668, 2006.

POGGIANI, S. S. C.; HATAYDE, M.; LAUFER-AMORIM, R.; WERNER, J. Expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, Irvine, v.2, p.41-47, 2012.

POLAKOWSKA, R.H.; PIACENTINI, M.; BARTLETT, R. Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm, and stem cells. **Developmental Dynamics**, Oxford, n.199, p.176-188, 1994.

QUEIROGA, F. L.; PIRES, I.; PARENTE, M.; GREGÓRIO, H.; LOPES, C. S. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **The Veterinary Journal**, Philadelphia, v. 189, p. 77-82, 2011.

RATHORE, K.; ALEXANDER, M.; CEKANOVA, M. Piroxican inhibits Masitinib-induced cyclooxygenase 2 expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. **Translational Research**, Philadelphia, v.164, n.2, p.158-168. 2014.

REBUZZI, L.; WILLMANN, M.; SONNECK, K.; GLEIXNER, K. V.; FLORIAN, S.; KONDO, R.; MAYERHOFER, M.; VALES, A.; GRUZE, A.; PICKL, W. F.; THALHAMMER, J. G.; VALENT, P. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Philadelphia, v. 115, p. 320-333, 2007.

REISSER, C.; EICHHORN, K.; HEROLD-MENDE, C.; BORN, A. I.; BANNASCH, P. Expression of facilitative glucose transport proteins during development of squamous cell carcinomas of the head and neck. **International Journal of Cancer**, Oxford, v. 80, p. 194-198, 1999.

RELF, M.; LEJEUNE, S.; SCOTT, P. A. E.; FOX, S.; SMITH, K.; LEEK, R.; MOGHADDAM, A.; WHITEHOUSE, R.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. **Cancer Research**, v. 57, p. 963-969, 1997.

RESTUCCI, B.; PAPPARELLA, S.; MAIOLINO, P.; DE VICO, G. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 39, p. 488- 493, 2002.

RESTUCCI, B.; MAIOLINO, P.; PACIELLO, O.; MARTANO, M.; DE VICO, G.; PAPPARELLA, S. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. **Journal of Comparative Pathology**, Philadelphia, v. 128, p. 252-259, 2003.

ROGERS, K.S.; HELMAN, R.G.; WALKER, M.A. Squamous cell carcinoma of the canine nasal planum: eight cases (1988-1994), **Journal of the American Animal Hospital Association**, Lakewood, v.31, p.373-378, 1995.



RONDELLI, M. C. H. Dermatologia. In: CRIVELLENTI, L. Z.; BORIN-CRIVELLENTI, S. **Casos de Rotina em Medicina Veterinária de Pequenos Animais**. São Paulo: MedVet Editora, 2012. p.17-65.

RÖWERT-HUBER, J.; PATEL, M. J.; FORSCHNER, T.; ULRICH, C.; EBERLE, J.; KERL, H.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 156, suppl. 3, p. 8-12, 2007.

RUHRBERG, C. Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. **Bioessays**, Oxford, v. 11, n. 25, p. 1052–1060, 2003.

RUSSELL, J. O.; HOSCHAR, A. P.; SCHARPF, J. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: a clinicopathologic series. **American Journal of Otolaryngology**, Philadelphia, v. 32, p. 557–563, 2011.

SANTIN, A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A. R.; PECORELLI, S.; CANNON, M. J.; PARHAM, G. P. Secretion of vascular endothelial growth factor in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Obstetrics & Gynecology**, Washington, v. 94, n. 1, p. 78-82, 1999.

SANTOS, R.; ANDRE, R. G. B.; VOLPE, C. A. Estimativa da Radiação solar global em Jaboticabal, SP. **Científica**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 31-39, 1983.

SCOTT, D. W.; MILLER JR, W. H. Squamous cell carcinoma arising in chronic discoid lupus erythematosus nasal lesions in two german shepherd dogs. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1995.

SCOTT, D.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. In: \_\_\_\_\_. **Small animal dermatology**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2001.

SCHMIDT, B.R.; GLICKMAN, N.W.; DENICOLA, D.B. De GORTARI, A.E.; KNAPP, D.W. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.1, n.11, p.1783-1786, 2001

STOCKFLETH, E.; KERL, H. Guidelines for the management of actinic keratoses. **European Journal of Dermatology**, Paris, v.16, n.6, p.599-606, 2006.

SU, J.-L.; SHIH, J.-Y.; YEN, M.-L.; JENG, Y.-M.; CHANG, C.-C.; HSIEH, C.-Y.; WEI, L.-H.; YANG, P.-C.; KUO, M.-L. Cyclooxygenase-2 induces EP1- and HER-2/Neu-dependent vascular endothelial growth factor-C up-regulation: a novel mechanism of lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 64, p. 554-564, 2004.

TAKAHASHI, Y.; KITADAI, Y.; BUCANA, C. B.; CLEARY, K. R.; ELLIS, L. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 55, p. 3964-3968, 1995.

THOMAS, R. C.; FOX, L. E. Tumors of the skin and subcutis. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998. p. 489-510.

UCHIDA, S.; SHIMADA, Y.; WATANABE, G.; TANAKA, H.; SHIBAGAKI, I.; MIYAHARA, T.; ISHIGAMI, S.; IMAMURA, M. In oesophageal squamous cell carcinoma vascular endothelial growth factor is associated with p53 mutation, advanced stage and poor prognosis. **British Journal of Cancer**, London, v. 77, n. 10, p. 1704-1709, 1998.

UEHARA, M.; SANO, K.; IKEDA, H.; SEKINE, J.; IRIE, A.; YOKOTA, T.; TOBITA, T.; OHBA, S.; INOKUCHI, T. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Philadelphia, v. 40, p. 321-325, 2004.

YAMAMOTO, T.; SEINO, Y.; FUKUMOTO, H.; KOH, G.; YANO, H.; INAGAKI, N.; YAMADA, Y.; INOUE, K.; MANABE, T.; IMURA, H. Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 170, p. 223-230, 1990.

YOUNES, M.; LECHAGO, L. V.; SOMOANO, J. R.; MOSHARAF, M; LECHAGO, J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 56, p. 1164-1167, 1996.

WEBB, AJ.; CALHOUN, M.L. The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, n,15, p.274-280, 1954.

WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 147, p. 9-19, 1995.

WERMKER, K.; KLUWIG, J.; SCHIPMANN, S.; KLEIN, M.; SCHULZE, H. J.; HALLERMANN, C. Prediction score for lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma of the external ear. **European Journal of Surgical Oncology**, p. 1-8 (in press), 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejso.2014.07.039>>.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Withrow & MacEwen's Small Animal Oncology**. 4. ed. Saint Louis: Saunders, 2007, p. 846.

**APÊNDICE**

## Desparafinização e Reidratação

<b>Solução</b>	<b>Tempo (min)</b>
Xilol I	5
Xilol II	5
Álcool absoluto I	3
Álcool absoluto II	3
Álcool 70% I	3
Álcool 70% II	3
Álcool 50% I	3
Álcool 50% II	3