

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS p53, p63 E PUMA NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
CORNEAL DE CÃES**

**Lucas Bahdour Cossi**

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS p53, p63 E PUMA NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
CORNEAL DE CÃES**

**Lucas Bahdour Cossi**

**Orientador: Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C836d Cossi, Lucas Bahdour.  
Detecção das proteínas p53, p63 e puma no carcinoma de células escamosas corneal de cães / Lucas Bahdour Cossi. -Araçatuba: [s.n.], 2013  
62 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba  
Orientador: Prof. Alexandre Lima de Andrade

1. Carcinoma de células escamosas 2. Imunoistoquímica 3. Córnea 4. Proteína supressora de tumor p53 5. Proteínas reguladoras de apoptose I. T.

CDD 636.0896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba  
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** Detecção das proteínas p53, p63 e PUMA no carcinoma de células escamosas  
corneal de cães.

**AUTOR:** LUCAS BAHDOUR COSSI

**ORIENTADOR:** Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

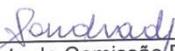
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

  
Dra. SILMARA SANAE SAKAMOTO DE LIMA

  
Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO

  
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

**DATA DA REALIZAÇÃO:** 20 de dezembro de 2013.

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE  
- Orientador -

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**LUCAS BAHDOUR COSSI** – nascido em 13 de Junho de 1981, na cidade de São José do Rio Preto– SP, formado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista– Araçatuba– SP, com Residência em Clínica Médica e Cirúrgica pelo Centro Universitário de Rio Preto– SP e Pós Graduação “*Lato Sensu*” em Oftalmologia Veterinária pela Anclivepa São Paulo em parceria com a Universidade Anhembí-Morumbi– SP.

## EPÍGRAFE

“Ninguém vale pelo que sabe, mas pelo que faz com aquilo que sabe”.

Leonardo Boff

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a meus pais Nádía Bahdour Cossi e Cláudio Roberto Cossi por sempre me incentivar e fazer de tudo para proporcionar o melhor para mim, permitindo que eu possa a cada dia crescer mais e realizar novas conquistas.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar o meu caminho e permitir que cada dia eu possa levantar e correr atrás de meus objetivos.
- Agradeço ao meu orientador Prof. Alexandre Lima de Andrade, um exemplo de profissional, que acreditou e confiou em mim, pelos ensinamentos e orientações que me fizeram crescer ainda mais profissionalmente e pessoalmente.
- Agradeço às professoras Maria Cecília Rui Luvizotto e Flávia de Rezende Eugênio pela inestimável colaboração durante a qualificação desta dissertação e pelos ensinamentos durante toda a graduação, colaborando com minha formação profissional.
- Agradeço à Profa. Tereza Cristina Cardoso por ceder, gentilmente, seu laboratório para a realização das imunistoquímicas e imagens deste projeto.
- Agradeço imensamente à médica veterinária Dra. Silmara Sanae Sakamoto de Lima por ter ajudado muito durante a realização das imunistoquímicas deste projeto, se dedicando grande parte de seu tempo para colaborar com esse trabalho. Muito obrigado!!!
- Agradeço aos veterinários Gabriel Thadeu Nogueira Martins Ferreira e a Talita Floering Brêda Souza pela grande amizade que fizemos e preocupação em sempre me acolher com muito carinho e atenção em sua casa na cidade de Araçatuba, orientando também nas dúvidas que tinha no decorrer dessa pós-graduação.
- Agradeço à minha namorada Araceli Cristina Intelizano por sempre me apoiar em todas minhas decisões, sem nunca questionar das horas de convívio que minha profissão nos privou.
- Agradeço aos meus irmãos Thiago Bahdour Cossi e Andressa Bahdour Cossi pelo incentivo em minha carreira.

- Agradeço aos meus colegas de profissão, principalmente da minha cidade de São José do Rio Preto e região, pela compreensão nos momentos que não estive presente na cidade para poder ajudá-los na área que me apaixonei, a oftalmologia, devido aos afazeres dessa minha conquista.
- Agradeço aos meus colegas que me ajudaram e permitiram a realização dos procedimentos realizados nos animais deste estudo.
- Agradeço à todos do Centro Universitário de Rio Preto- UNIRP, que de uma forma ou de outra, colaboraram e me incentivaram em correr atrás deste objetivo.
- Agradeço à todos da Unesp Araçatuba, aos funcionários, às bibliotecárias, em especial a Isabel Pereira de Matos, e principalmente aos professores desta instituição, pelo grande aprendizado, desde minha graduação até os dias de hoje. Sem vocês essa realização profissional não seria possível.
- Agradeço aos amigos do Programa de Pós-graduação pelo convívio, amizade e orientações.
- Agradeço à Dra. Adriana Lima Teixeira e Dra. Renata Squarzoni, coordenadoras do curso de especialização em oftalmologia veterinária da Anclivepa-SP, pelos ensinamentos e dedicação durante a realização de minha pós graduação em oftalmologia veterinária, sendo grandes responsáveis pelo incentivo e despertar desta etapa que se conclui agora.
- Agradeço ao Dr. Eduardo Perlmann pela colaboração com parte dos histopatológicos e imagens destes.
- Agradeço ao meu grande amigo e veterinário Dr. Rodrigo Storti Pereira pela grande colaboração na avaliação das imunoistoquímicas deste projeto, me ensinando sobre essa importante área da veterinária que é a patologia.
- Agradeço ao Dr. Felipe Sueiro, proprietário e responsável pelo laboratório de análises veterinárias Vet Pat, pela enorme colaboração na

realização dos histopatológicos e informações técnicas a respeito do assunto tratado nessa dissertação.

- Agradeço ao médico veterinário Claudio Assis, que cedeu, gentilmente, uma amostra dos casos aqui estudados.
- Agradeço aos animais, aos quais também colaboraram para nosso aprendizado; à eles, o meu imenso respeito.

## SUMÁRIO

Página

I INTRODUÇÃO.....	16
II REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Neoplasias oculares.....	19
2.2 Conceitos sobre a carcinogênese.....	23
2.3 Apoptose.....	25
2.4 Proteína p53.....	27
2.5 Proteína PUMA.....	29
2.6 Proteína p63.....	33
III OBJETIVOS.....	36
IV MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1 Amostras.....	37
4.2 Avaliação anatomopatológica .....	37
4.3 Imunoistoquímica.....	38
4.4 Avaliação microscópica da imunoistoquímica.....	39
V RESULTADOS.....	41
VI DISCUSSÃO.....	47
VII CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Apresentação clínica de cães com carcinoma de células escamosas corneal.....	22
FIGURA 2- Imagem do caso representado pela amostra 1 apresentando CCE corneal axial (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 4x (B). Fotomicrografias da imunoexpressão para citoqueratina, 20x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 40x (F).....	44
FIGURA 3- Imagem do caso representado pela amostra 4 apresentando CCE corneal axial (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 4x (B). Fotomicrografias da imunoexpressão para citoqueratina, 40x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 40x (F).....	45
FIGURA 4- Imagem do caso representado pela amostra 6 apresentando ceratite actínica (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 10x (B). Fotomicrografias da imunoexpressão para citoqueratina, 40x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 20x (F).....	46

## LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Relação dos anticorpos primário, fabricantes e diluições utilizados.....	39
TABELA 2- Distribuição das amostras tumorais coletadas em cães, segundo a idade, raça, sexo, localização e diagnóstico histopatológico. Araçatuba, 2013.....	41
TABELA 3- Descrição histológica das amostras de carcinoma de células escamosas corneal quanto ao grau de malignidade encontrado. Araçatuba, 2013.....	42
TABELA 4- Representação gráfica das amostras avaliadas quanto à intensidade e frequência da marcação, segundo os diferentes marcadores utilizados. Araçatuba, 2013.....	43

## **DETECÇÃO DAS PROTEÍNAS p53, p63 E PUMA NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CORNEAL DE CÃES**

**RESUMO** – As neoplasias oculares representam uma crescente preocupação na oftalmologia veterinária. O carcinoma de células escamosas (CCE) corneal é raro em cães, pouco estudado e as investigações sobre os mecanismos da carcinogênese são escassos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a imunexpressão das proteínas p53, p63 e PUMA e suas possíveis contribuições quanto ao prognóstico e terapêutica no CCE corneal espontâneo de cães. Foram identificados seis casos, cinco diagnosticados como CCE e um como ceratite actínica. Na imunohistoquímica avaliou-se o número de células marcadas por campo no microscópio adotando-se dois critérios de classificação, quanto à intensidade e quanto à frequência de marcação. Também foi avaliada a graduação histológica dos tumores quanto ao grau de malignidade nos casos de carcinoma de células escamosas de córnea, utilizando o índice mitótico como principal referência. Todas as amostras apresentaram imunomarcação para as proteínas estudadas, porém com intensidade e frequência variadas. Não foi observada relação entre maior índice mitótico e, portanto, maior malignidade, com uma maior expressão de qualquer uma das proteínas analisadas. Conclui-se que a imunexpressão das proteínas p53, p63 e PUMA estão presentes nos CCE corneal de cães podendo contribuir para sua carcinogênese, mas não fornece indicadores de prognóstico nesta neoplasia.

**Palavras-chave:** carcinoma de células escamosas, córnea, imunohistoquímica, proteína supressora de tumor p53, proteínas reguladoras de apoptose

## **p53, p63 AND PUMA PROTEIN EXPRESSION IN CORNEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF DOGS**

**SUMMARY** – Ocular tumors play an increasing concern in veterinary ophthalmology. Corneal squamous cell carcinoma (SCC) is unfrequent in dogs, and by this way it has little studies, and the investigations of carcinogenesis mechanisms are rare. The aim of this work was to identify the p53, p63 and PUMA proteins expression in the spontaneous dog corneal SCC. For this work, were used five cases of corneal SCC and one case of actinic keratitis and their possible contributions to prognosis and therapy. The immunohistochemical analysis could evaluated the number of stained cells by field in optic microscopy using two classifications methods: intensity and immunofrequency. Also, we could evaluated histological grade of tumor related to malignancy in corneal SCC cells by using the mitotic index as a pattern. All samples showed immunolabelling to those proteins studied, although with diversity in intensity and frequency. The authors couldn't observe relationship between the biggest mitotic index, and, by this way, most malignancy, with the expressions of all analysed proteins. These results could support the conclusions that p53, p63 and PUMA proteins immunoexpression are present in canine corneal SCC and could give help to their carcinogenesis, but they don't give a prognostic indicator of these tumors.

**Keywords:** squamous cell carcinoma, cornea, immunohistochemistry, tumor suppressor protein p53, apoptosis regulatory proteins

## I INTRODUÇÃO

Há uma variedade de neoplasias que acometem a conjuntiva e os anexos oculares de animais domésticos que foram relatadas na literatura, mas ainda pouco expressivas (DUBIELZIG, 1990; MONTIANI-FERREIRA et al., 2009). As neoplasias da córnea são raras e quase sempre apresentam-se como uma extensão secundária de lesões com foco primário em outro segmento do bulbo. Os tumores oculares (extra e intrabulbares) representam uma crescente preocupação na oftalmologia veterinária (LATIMER et al., 1987; MONTIANI-FERREIRA et al., 2009), portanto, trata-se de um assunto que merece novas e originais investigações.

O carcinoma de células escamosas (CCE) em córnea ou conjuntiva é mais comum em outras espécies havendo poucos relatos em cães (KARASAWA et al., 2008; LATIMER et al., 1987; WARD et al., 1992). Por ser incomum no cão, um erro no diagnóstico pode retardar potencialmente o tratamento e aumentar a sua morbidade (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008, 2009).

Poucos estudos investigando os mecanismos de carcinogênese que contribuem para o desenvolvimento do CCE em cães e gatos foram conduzidos (WEBB et al., 2009). A etiopatogênese das neoplasias de células escamosas, particularmente das regiões ocular e periocular, não está completamente compreendida; no entanto, algumas causas potenciais podem ser incluídas, como a radiação ultravioleta (BERNAYS et al., 1999; BUSSE et al., 2008).

O diagnóstico imediato de neoplasia ocular é fundamental para uma intervenção terapêutica precoce, especialmente porque tumores de pequenas dimensões são mais sensíveis ao tratamento local, podendo até mesmo se obter a cura definitiva (WEBB et al., 2009; WILLIS; WILKIE, 2001).

A transformação neoplásica consiste em um processo multicausal, no qual os controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula são perdidos. A ativação aberrante dos proto-oncogenes, em conjunto com a

inibição não regulada dos genes supressores tumorais, representam os fundamentos desse processo. Mais de 100 genes já foram catalogados como pertencentes a essas categorias nos cânceres humanos, embora se estime que muitos outros ainda possam por ser identificados (FARIA; RABENHORST, 2006).

Um conjunto de alterações moleculares em diferentes níveis de regulação é responsável pelo estabelecimento do câncer. A modificação numa célula normal raramente é suficiente para deflagrar o processo tumorigênico. Todavia, a alteração de alguns genes com papel central em múltiplos canais regulatórios revela o potencial impacto de uma única desordem molecular para a promoção da neoplasia (FARIA; RABENHORST, 2006).

O conhecimento sobre o genoma dos cães tem crescido na última década, e isso tem favorecido a compreensão dos mecanismos envolvidos na geração das neoplasias. Devido aos avanços na biologia molecular, foi identificada uma gama de marcadores que podem ser usados para estratificar muitos tipos de neoplasias, tanto em seres humanos e cães, colaborando para o estudo das neoplasias. Assim, muitos genes têm sido identificados nos últimos 20 anos. Esses genes, bem como as suas proteínas codificadas, têm finalidades múltiplas, além de participarem nas funções da célula associada ao crescimento celular e proliferação (LOPES et al., 2010).

Os genes que participam da formação de tumores são, principalmente, os que nas células normais estão envolvidos com o controle do ciclo celular, reparação do DNA danificado e apoptose. São os genes supressores de tumores, os anti-oncogenes e os oncogenes (LOPES et al., 2002).

As mutações do gene TP53 são comuns em muitos tumores, o que sugere que a proteína p53 previne o câncer como um “guardião crítico” que compromete a programação de células geneticamente modificada. Desempenham importantes funções específicas como um agente supressor de proliferação celular no reparo do DNA e exerce um importante papel na indução de morte celular programada, a apoptose (LOPES et al., 2010). A proteína PUMA é eficaz na indução da apoptose e, quando expressa, promove

a morte de células cancerosas dentro de algumas horas; podendo, potencialmente, ser usada como um novo alvo para terapia anticâncer. Agentes que ativam a PUMA, através de mecanismos independentes de p53, podem restaurar a resposta apoptótica nas células tumorais, poupando células normais (YU; ZHANG, 2003). A proteína p63 é caracterizada por diferentes capacidades de transativação de genes relatores, induzindo a apoptose e funcionando como agente dominante negativo (PELOSI et al., 2002).

A compreensão dos mecanismos apoptóticos permitiu o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer, baseando-se na indução da morte de células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (GRIVICICH et al., 2007).

O desenvolvimento de agentes que podem induzir ou aumentar a extensão da apoptose parece ser uma promissora estratégia no tratamento do câncer (LEE et al., 2008).

Ainda assim, o estudo da imunorreatividade de proteínas no câncer tem-se revelado importante ferramenta de trabalho na rotina diagnóstica e de pesquisa. A imunoistoquímica tornou-se uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios de diagnóstico e de pesquisa. Atualmente, as tecnologias em genética molecular têm facilitado os estudos dos genes, fornecendo maior conhecimento dos mecanismos etiológicos.

## II REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Neoplasias oculares

As neoplasias oculares podem ser primárias ou secundárias; estas últimas manifestam-se como metástases de tumores não oculares. As neoplasias oculares primárias são raras e, por isso, seu comportamento ainda é pouco conhecido. Isso é agravado pelo fato de que o diagnóstico precoce não impede, às vezes, a perda do olho, pois a enucleação ainda é o tratamento de escolha, apesar de novas modalidades terapêuticas serem descritas (WERNER et al., 1998).

A ocorrência de neoplasias dos anexos oculares é relativamente comum na clínica médica de pequenos animais, comparadas às neoplasias da órbita, em particular as primárias. Já os tumores intra-oculares também são relativamente incomuns nos animais domésticos, mas ainda assim, o bulbo ocular é, sem dúvida, um local onde se pode diagnosticar uma variedade de neoplasias primárias e secundárias (metastáticas). Os tumores intra-oculares podem ser ou não visíveis ao exame oftálmico. Em quaisquer circunstâncias, seus efeitos sobre a função ocular e a visão podem ser drásticos (MONTIANI-FERREIRA et al., 2009; WERNER et al., 1998).

O olho é um local pouco frequente para metástase de neoplasias originadas de outros locais, mas a possibilidade de doença ocular causada pela disseminação hematogena deve ser considerada. Qualquer exame ocular deve ser combinado com um exame físico completo e minucioso (DUBIELZIG, 1990).

O carcinoma de células escamosas (CCE) ou carcinoma espinocelular é uma doença neoplásica maligna das células epiteliais escamosas que comumente afeta animais de peles despigmentadas (BERNAYS et al., 1999; KARASAWA et al., 2008). Os crescimentos proliferativos acometendo as

pálpebras e a conjuntiva dos cães são os mais comumente relatados, representados pelos adenomas tarsais, papilomas virais, melanomas/melanocitomas (MONTIANI-FERREIRA et al., 2009).

As neoplasias da córnea são raras e, quase sempre, representam uma extensão secundária de lesões com foco primário em outro segmento do bulbo do olho; geralmente resulta do crescimento de uma massa conjuntival ou limbar (BERNAYS et al., 1999; BUSSE et al., 2008; LATIMER et al., 1987; WARD et al., 1992). No que se refere aos CCE no bulbo do olho, ele surge do epitélio conjuntival do limbo, da conjuntiva bulbar, da membrana nictitante, ou da epiderme das pálpebras, ocorrendo com maior frequência no gato e em outras espécies, como bovinos, equinos, homem e, raramente, tem sido relatado em cães (KAPS et al., 2005; KARASAWA et al., 2008; LATIMER et al., 1987; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008; WARD et al., 1992; WERNER et al., 1998). O CCE em córnea de cães é, certamente, pouco comum e um diagnóstico impreciso pode atrasar potencialmente o tratamento e aumentar a morbidade (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008).

O CCE corneal primário ocorre em cães quando a massa neoplásica surge diretamente a partir da córnea. Este neoplasma é classificado como uma neoplasia corneal intra-epitelial (carcinoma *in situ*), uma vez que a membrana basal encontra-se intacta (LATIMER et al., 1987; WARD et al., 1992). Morfologicamente, o CCE corneal apresenta uma invasão direta e profunda no estroma da córnea com penetração até próxima da membrana de Descemet, a qual, em contraste com a membrana basal da córnea, parece ser bem resistente à invasão neoplásica, pois não há relatos dessa ocorrência. Quando originado do limbo, o CCE pode se espalhar mais profundamente, e se desenvolver ao redor da borda da membrana de Descemet, infiltrando-se dentro do trabeculado e do ângulo iridocorneal. Ele pode até mesmo progredir por dentro do músculo ciliar, processo ciliar ou íris (KAPS et al., 2005). Acredita-se que os carcinomas de córnea mostram menor poder de invasão devido à resistência do estroma e da membrana de Descemet (GALERA; MARTINS, 2001). Apesar de metástases do CCE ocular serem raras, elas

podem ocorrer em linfonodos regionais da cabeça, e a invasão local agressiva pode se propagar pelos tecidos adjacentes (WARD et al., 1992).

O tumor ocular surge através de uma série de mudanças pré-cancerosas em resposta à injúria actínica, assim como CCE cutâneo induzido pela luz solar (WILCOCK, 2007). Lesões neoplásicas do epitélio escamoso na superfície ocular incluem ceratite actínica, displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma de células escamosas invasivo (ARYA et al., 2008). Quando há invasão da membrana basal (lâmina própria) a lesão denomina-se carcinoma invasivo de células escamosas (BALLALAI et al. , 2003).

A etiopatogênese do tumor de células escamosas, particularmente o CCEs da região ocular e periocular não é completamente compreendida, mas algumas causas potenciais podem ser relacionadas: trauma contínuo, agentes virais, fatores hormonais, fatores genéticos e imunológicos, falta de pigmentação nos tecidos periorculares, irritação crônica da superfície ocular, assim como a ceratoconjuntivite seca (CCS) e ceratite pigmentar, uso de imunossupressores tópicos e exposição crônica à radiação solar; sendo o componente ultravioleta o agente carcinogênico mais plausível (BERNAYS et al., 1999; BUSSE et al., 2008; DREYFUS et al., 2011; KAPS et al., 2005; MILLER; DUBIELZIG, 2007; MONTIANI-FERREIRA et al., 2008; WEBB et al., 2009).

A aparência clínica da neoplasia ocular varia de modo considerável dependendo do tecido envolvido. Clinicamente, observa-se uma variedade de sinais clínicos no tecido afetado ou nas estruturas adjacentes. Caracteriza-se pelo aparecimento de estruturas de coloração diferente, opacidade dos meios oculares, desconforto e mudança na forma do bulbo ocular. Em muitos casos, o animal apresenta-se com uma “massa” visível, que pode se apresentar sob algumas formas: de lesão superficial, ulcerada, proliferativa e elevada, e crescimento em forma de “couve flor” (Figura 1). Estes sinais, com frequência, são os motivos que fazem com que os proprietários procurem por ajuda profissional especializada (MONTIANI-FERREIRA et al., 2009; WEBB et al., 2009).



FIGURA 1- Apresentação clínica de cães com carcinoma de células escamosas corneal (Fonte: arquivo pessoal).

O diagnóstico precoce do CCE é essencial para uma intervenção terapêutica também precoce, podendo resultar em controle por um longo tempo ou na cura definitiva. Pode-se suspeitar do CCE baseado na aparência grosseira da lesão e localização, mas o diagnóstico definitivo requer exame microscópico do tecido envolvido (WEBB et al., 2009).

A córnea e a conjuntiva são tecidos de fácil acesso, o que possibilita um detalhado exame clínico, além da utilização de técnicas para obtenção de material para exame morfológico, que podem contribuir para o diagnóstico (LIMA et al., 2005). Um exame clínico minucioso, aliado aos procedimentos diagnósticos, é imprescindível para determinar natureza, origem, localização e extensão da neoplasia ocular. O conhecimento dos dados estatísticos e da prevalência das neoplasias relacionadas com o bulbo do olho é útil e auxilia na conclusão diagnóstica e prognóstica (MONTIANI-FERREIRA et al., 2009).

O rápido diagnóstico na clínica oncológica é essencial, devendo ir além dos diagnósticos clínico e histológico rotineiros, buscando informações sobre todos os aspectos envolvidos, através de técnicas e/ou exames mais específicos. O uso da técnica de imunistoquímica em patologia veterinária tem sido limitado devido à falta de anticorpos contra os tecidos animais; no entanto, podem ser utilizados os anticorpos que apresentam reatividade cruzada entre

antígenos humanos e animais de laboratório que, juntamente com outros exames (citologia e histologia), contribuem para o diagnóstico definitivo e preciso desses tumores (TEIXEIRA et al., 2011).

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

## **2.2 Conceitos sobre a carcinogênese**

No organismo normal, o ciclo de proliferação celular é rigorosamente controlado para que as células constituam comunidades organizadas. No entanto, as células cancerígenas não se submetem a esse esquema de cooperação, possuindo DNA (ácido desoxirribonucléico) danificado e que, por isso, escapam dos mecanismos de controle do ciclo celular. O “câncer” surge de uma única célula que sofreu mutação, multiplicando-se por mitoses e suas descendentes acumulam outras mutações até darem origem a uma célula cancerosa, portanto, a incidência destes tumores caracteriza-se pela proliferação celular anormal, cuja denominação correta é neoplasia (LOPES et al., 2002).

O câncer surge como uma consequência de múltiplos eventos genéticos e moleculares em muitos genes e cromossomos. A consequência destes danos é a alteração no controle dos processos envolvidos no equilíbrio do ciclo de crescimento e de mecanismos de reparação ao dano celular (CASTAÑEDA et al., 2007).

Novas abordagens genéticas e bioquímicas têm fomentado notável progresso na compreensão da biologia do câncer. Um dos avanços mais importantes tem sido o reconhecimento de que a resistência à morte celular -

particularmente da morte celular apoptótica - é um aspecto importante da tumorigênese e do desenvolvimento de resistência a fármacos anticancerígenos. Pesquisas sobre novas terapêuticas do câncer têm focado na elaboração de formas de superar esta resistência e de desencadear a apoptose de células tumorais (OKADA; MAK, 2004).

Muito tem sido escrito sobre a sinalização da morte celular e de sua sobrevivência. A evasão da morte celular é uma característica integrante de quase todos tumores e é agora reconhecido que os produtos de ambos genes supressores de tumores e de oncogenes são mediadores comuns de morte celular e de supressão de morte celular, respectivamente (CHARI et al., 2009).

A exposição a agentes nocivos ao DNA, provavelmente, contribui para o desenvolvimento de muitos cânceres humanos. Portanto, esforço têm sido concentrados para compreender como as células respondem aos danos no DNA e na restauração da integridade da sequência linear do DNA e estrutura da cromatina. Um componente importante da resposta celular ao dano no DNA é uma inibição da replicação de sua síntese. Presumivelmente, esta resposta permite ótima reparação de danos antes de a célula reiniciar a síntese de replicação do DNA e/ou começar a mitose. A inibição da replicação da síntese do DNA após os seus danos pode ser um passo crítico para se evitar o aumento progressivo e alterações genômicas, que caracterizam a transformação neoplásica. Além disso, as células que são ineficientes neste processo inibitório podem ser propensas ao desenvolvimento de neoplasias (KASTAN et al., 1991).

O processo pelo qual uma célula normal se desenvolve em uma célula maligna com a capacidade de formar um tumor requer várias alterações celulares. A evasão de morte celular por apoptose é uma das alterações propostas. De maneira importante, a evasão da apoptose também é reconhecida por resultar na resistência a terapias anti-câncer. Muitos pesquisadores têm, portanto, focado encontrar maneiras para contornar essa resistência à apoptose, a fim de melhorar o tratamento de pacientes com câncer. O detalhado conhecimento sobre os eventos moleculares que

contribuem para o sucesso do tratamento irá facilitar uma abordagem mais racional no controle do câncer (DE BRUIN; MEDEMA, 2008).

### **2.3 Apoptose**

A apoptose é um programa de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência, que requer a interação de inúmeros fatores. As alterações morfológicas observadas são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. É um processo evolutivamente conservado por um organismo para remover as células indesejadas ou danificadas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Tais alterações incluem a retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Muitas são as moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre estas, as proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, além das caspases (GRIVICICH et al., 2007).

A resposta apoptótica é mediada por duas principais vias nas células de mamíferos, via intrínseca (mitocondrial) ou extrínseca (citoplasmática), dependendo da origem dos estímulos de morte. A via extrínseca é mediada pela família de receptor morte de proteínas. Após a ligação com o receptor na superfície da célula, o recrutamento de moléculas adaptadoras resulta em ativação da caspase-8 e subsequente ativação de outras caspases. A via intrínseca é acionada em resposta a uma variedade de estímulos de morte que, por sua vez, são gerados a partir de dentro da célula, tais como a ativação de oncogenes e danos no DNA. A inativação desta via é geralmente considerada como uma característica do câncer. Esta via é mediada pela mitocôndria, tendo as proteínas da família Bcl-2 como reguladoras chave desta via. As interações

entre os membros da família controlam a liberação de proteínas apoptogênicas, incluindo citocromo-c, que levam à morte celular eventual, através de mecanismos caspase-dependente e caspase-independente. Tem sido sugerido que a via intrínseca é principalmente utilizada na apoptose mediada por p53, enquanto a via extrínseca é utilizada para aumentar a resposta apoptótica (RIEDL; SHI, 2004; YU; ZHANG, 2005).

As caspases, que são as executoras da apoptose, compreendem duas classes distintas, as iniciadoras, que incluem a caspase-2, -8, -9 e -10, e as efetoras que incluem a caspase-3, -6 e -7. Embora características estruturais gerais são comuns entre as caspases iniciadoras e efetoras, sua ativação, inibição e liberação da inibição são diferencialmente reguladas. Uma vez ativada, as caspases efetoras são responsáveis pela clivagem proteolítica de um amplo espectro de alvos celulares, levando, em última instância, à morte celular. Estudos bioquímicos e estruturais culminaram em importantes avanços na compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes de regulação das caspases (OKADA; MAK, 2004; RIEDL; SHI, 2004).

A desregulação da apoptose conduz a uma variedade de enfermidades em humanos, incluindo câncer, doenças auto-imunes e desordens neurodegenerativas. Desde que o conceito de apoptose foi criado em 1972, esforços nas pesquisas levaram à identificação de centenas de genes que controlam o início, execução e regulação de apoptose em várias espécies. Investigações demonstraram que a apoptose desempenha um papel significativo na patogênese dos tumores. Várias proteínas ou oncogenes e genes supressores estão envolvidos no processo de apoptose (OKADA; MAK, 2004; RIEDL; SHI, 2004).

## 2.4 Proteína p53

A proteína p53 supressora de tumores, que possui fundamental papel no controle do crescimento e neoplasias, tem sido uma das proteínas mais extensivamente estudadas nos últimos anos e está entre as mais comumente alteradas no câncer humano. Por sua vez, o gene TP53 é considerado como um dos genes mutados mais associado ao desenvolvimento de câncer. Uma questão interessante é a elucidação dos mecanismos moleculares fisiológicos e patológicos da proteína. O supressor de tumor p53 é uma proteína multifuncional que exerce uma variedade de efeitos e, desempenha um papel central na regulação do ciclo celular normal. Essa proteína medeia funções críticas dentro das células, incluindo a resposta ao estresse genotóxico, senescência, diferenciação e morte celular. A perda de função da p53 pode resultar em taxas maiores de proliferação celular, resistência a estímulos de morte celular, instabilidade genômica e metástase. Esta informação permite a concepção de agentes terapêuticos para as proteínas-alvo, incluindo a p53 (ALMOG; ROTTER, 1997; CHARI et al., 2009).

A proteína p53 controla a progressão de células da fase G1 para a fase S do ciclo celular, atuando como regulador negativo do crescimento celular em resposta a ocorrência de dano ao DNA, com o intuito de restaurar a integridade genômica. A proteína p53, além de promover o reparo do DNA, atua também no controle da apoptose (SIROMA; BARACAT, 2006).

A proteína p53 se tornou amplamente reconhecida como um supressor de tumor, e o gene TP53 tornou-se, provavelmente, o local mais comum de alterações genéticas em tumores humanos (BAI; ZHU, 2006). Atualmente, a p53 é conhecida por desempenhar um papel fundamental em praticamente todos os tipos de cânceres humanos. E, mutação ou perda do gene TP53 pode ser identificada em mais de 50% de todos os casos de câncer humano em todo o mundo (BAI; ZHU, 2006; CHARI et al., 2009; FARNEBO et al., 2010), o que implica que células cancerosas mantêm a viabilidade, através da redução da

atividade biológica da p53 (WHITE et al., 2008). Isso enfatiza o papel central da via p53 na regulação de crescimento e sobrevivência celulares, fazendo com que seja um desafio pressuposto de que o desenvolvimento de um meio para a reparação de p53 é esperado para resolver uma grande parte do problema do câncer (ALMOG; ROTTER, 1997). Acredita-se que mutações do gene TP53 são as alterações genéticas mais comuns em neoplasias em cães, entretanto, pouco se sabe sobre ele e suas mutações (FARIA; RABENHORST, 2005).

Conhecida informalmente como "o guardião do genoma", a p53 protege os tecidos biológicos da transformação maligna e forma uma parte central da resposta que danifica o DNA (WHITE et al., 2008). Esse termo atribuído é decorrente da sua função como "policia molecular", por monitorar a integridade do genoma. Durante o ciclo de divisão celular, a p53 faz uma verificação se há eventual ocorrência de mutações na sequência do genoma, em consequência de uma replicação defeituosa do DNA, atuando como um sensor de danos, auxiliando no sistema de reparo. No caso de lesões por agentes físicos, químicos ou biológicos, é função da p53, através de uma cascata de reações, impedir que esta célula entre em processo de mitose e complete a divisão celular. Assim, dois caminhos podem ser seguidos: a correção da mutação através da ativação da proteína de reparo ou a indução à apoptose, prevenindo, dessa forma, que ocorra a proliferação de células com o DNA mutado (ARRUDA et al., 2008; CASTAÑEDA et al., 2007).

Pelo fato de o gene supressor de tumor TP53, ser um fator de transcrição importante e desempenhar um papel central nos mecanismos de regulação do ciclo celular, sua inativação é considerada um evento de destaque na carcinogênese (CASTAÑEDA et al., 2007). Esse gene codifica uma proteína de ligação envolvida no DNA na parada do ciclo celular e na apoptose. Em resposta ao dano no DNA, a p53 se acumula nas células, transloca-se para o núcleo, ativa a transcrição de gene e, finalmente, resulta na parada do ciclo celular, fato que é necessário para permitir o reparo do DNA danificado antes da replicação celular. Assim, o reparo ocorre com a super expressão e com o conseqüente acúmulo da proteína p53 selvagem no núcleo.

Além disso, a p53 ativa um caminho da morte celular programada, presumivelmente em células com excessivos danos no DNA. A perturbação de qualquer via é esperada contribuir para a transformação neoplásica, uma vez que permite a replicação ou a sobrevivência das células com dano no DNA. Esta previsão é apoiada por muitos relatos de cânceres em que a p53 está mutada ou perdida (JIANG et al., 1999).

Em condições normais, a proteína p53 está presente em níveis baixos em todas as células devido ao seu rápido *turnover*, através de proteólise. A forma inativa desta proteína é localizada no citoplasma em baixa concentração e tem uma meia vida relativamente curta, cerca de 20-30 minutos. Sob estas condições, a proteína p53 tem que receber sinais ou sofrer alterações que a ativem convertendo em proteína funcional. Sinais ou eventos que levam à ativação de p53 são principalmente associados ao estresse celular (danos ao DNA por radiação ionizante ou ultravioleta), hipóxia e ativação de oncogenes. Estes estímulos causam um aumento rápido nos níveis de proteína p53 na célula, tanto por aumento da estabilidade da proteína como por ativação bioquímica através da fosforilação e acetilação, que permitem que a proteína atue como um ligante na transcrição do DNA, em regiões determinadas por sequências de bases específicas localizadas em regiões promotoras e que regulem a expressão de seus genes (CASTAÑEDA et al., 2007). Essas metas regulam um número de processos celular, entre os quais dois melhores estudados são a parada do ciclo celular e apoptose (YU; ZHANG, 2005).

## **2.5 Proteína PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*)**

A proteína PUMA foi inicialmente identificada como um alvo transcricional de p53 e um mediador da apoptose induzida por danos no DNA. É um membro pró-apoptótico exclusivo BH3 da família Bcl-2, reguladores da apoptose. Como outras proteínas que possuem apenas o domínio BH3, a

PUMA induz à apoptose através de sua ligação aos membros pró-sobrevivência da família Bcl-2 libertando, assim, o efeito inibitório das proteínas pró-sobrevivência sobre proteínas pró-apoptóticas, Bax e Bak. Isto resulta na ativação de Bax e Bak, posterior liberação do citocromo-c da mitocôndria e, finalmente, a morte celular (CALLUS et al., 2008; MUSTATA et al., 2011; YOO et al., 2007).

A proteína PUMA serve como uma molécula de sinalização proximal que transduz sinais de morte para a mitocôndria, onde atua através de vários domínios dos membros da família Bcl-2 para induzir disfunção mitocondrial e ativação de caspases. Ela também pode ativar diretamente Bax/Bak ou a p53 citoplasmática para induzir disfunção mitocondrial (YU; ZHANG, 2008); e pode funcionar tanto como um facilitador, ligando-se a proteínas pró-sobrevivência como um ativador, ligando-se a Bax; e esta dupla função de PUMA parece ser coerente com sua eficiência como uma indutora da morte (YEE; VOUSDEN, 2008). É um mediador essencial da apoptose dependente e independente de p53 *in vivo*, sendo também extremamente eficaz na indução de apoptose quando expressa, matando as células cancerosas dentro de algumas horas (YU; ZHANG, 2003). Esta proteína pode regular diversas vias apoptóticas por contrariar alguns conhecidos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, podendo ser usada para reparar uma variedade de defeitos de apoptose em células cancerosas (CHEN et al., 2007).

As proteínas da família Bcl-2 regulam a apoptose através do controle permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). A PUMA é uma potente reguladora da MOMP e, Chipuk e Green (2009) sugerem que essa função é atribuída a dois mecanismos distintos, e que ambos dependem da ligação PUMA com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2.

Localizada na mitocôndria, a PUMA é um alvo principal de p53 e desempenha um papel-chave na apoptose, com capacidade para ligar e inibir as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (CHIPUK; GREEN, 2009; MAXIMOV; MAXIMOV, 2008).

Entre os fatores de transcrição que ativam a PUMA, a função da p53 é melhor entendida (YU; ZHANG, 2008). De acordo com Callus et al. (2008), a PUMA pode causar a apoptose, na ausência da p53. Em seu estudo, Yoo et al. (2007) não encontraram qualquer associação significativa da expressão de PUMA com a expressão da p53, o que sugere que pode haver outros mecanismos para a expressão dessa proteína, além transativação de p53.

A importância da PUMA na apoptose mediada por p53 sugere que os mecanismos para induzir ou imitar sua função pode ter um potencial terapêutico significativo em células tumorais com p53 mutante (YEE; VOUSDEN, 2008).

De acordo com Jeffers et al. (2003), a p53 endógena do tipo selvagem não é suficiente, na ausência de PUMA, para induzir a morte celular eficientemente. Para Yu e Zhang (2005), alguns alvos apoptóticos de p53, como PUMA, têm maior potencial na indução da apoptose do que p53. Eles podem ser usados como alvos para identificar pequenas moléculas ou como alvos para terapia genética

Pelo fato de PUMA ser um importante mediador da morte celular, é possível que a modificação do gene PUMA ou expressão aberrante da proteína PUMA seja responsável pela patogênese dos cânceres humanos (YOO et al., 2007).

A alta expressão de PUMA em células de cancer gástrico e sua falta em células normais da mucosa gástrica sugere que a expressão de PUMA pode desempenhar um papel no desenvolvimento de carcinomas gástricos (YOO et al., 2007). A morte celular mediada por p53 em células de câncer colorretal é, em parte, realizada pela ativação da transcrição do gene PUMA. A expressão de PUMA levou à uma apoptose muito rápida e intensa, podendo ser considerada como um substituto para p53 na terapia genética no câncer (YU et al., 2001). Ao avaliar a morte mediada por p53 em células de câncer colorretal em humanos, Yu e Zhang (2003) observaram que, se o gene PUMA também é interrompido em tais células, a apoptose é impedida.

A identificação da PUMA permite uma sinalização proximal de uma molécula, cuja expressão é regulada por fatores de transcrição em resposta a estes estímulos. A ausência ou a inibição da PUMA leva à deficiência de apoptose e, conseqüentemente, a um maior risco de desenvolvimento de câncer e resistência terapêutica. Embora a expressão elevada da proteína PUMA permita profunda quimio e radio-sensibilização em células cancerígenas, a inibição de sua expressão pode ser útil para diminuir a morte excessiva de células associadas a lesão tecidual e a doenças degenerativas. Portanto, ela serve como um sensor geral para estímulos da morte celular e um alvo farmacológico promissor para tratamento de câncer e danos aos tecidos (YU; ZHANG, 2008).

A interação de proteínas como PUMA/Bcl-2 é um passo crítico regulatório no início da apoptose. As características estruturais destas interações e sua dependência de um menor domínio BH3/PUMA pode torná-la um alvo atraente para o desenvolvimento de medicamentos. Inibidores de PUMA podem ser eficazes e seguros na proteção e atenuação nas radiações e talvez em outros tipos de danos nos tecidos associados com apoptose (MUSTATA et al., 2011).

A perda de resposta apoptótica por inativação da via p53 parece ser necessária para progressão maligna. Os agentes que ativam PUMA via mecanismos independentes de p53 podem restaurar a resposta apoptótica em células tumorais, poupando as células normais. É de interesse determinar se PUMA pode sensibilizar células mutantes de p53 para drogas anticâncer (YU; ZHANG, 2003). No entanto, seu papel na supressão do tumor não está bem estabelecido (YU, 2009).

O entendimento de que PUMA possa ser um mediador essencial da apoptose dependente de p53 revela um novo alvo que pode ser explorado quer para sensibilizar ou conferir resistência à quimioterapia e radioterapia (JEFFERS et al., 2003).

De acordo com Sun et al. (2007), a ausência de ativação da PUMA em células carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço contribui para

quimiorresistência e, a terapia genética com a PUMA, pode ser um substituto eficiente para que a p53 melhore as respostas das células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço à quimioterapia.

Os resultados encontrados por Sinicrope et al. (2008) indicam que a expressão de proteínas pró-apoptóticas que possuem apenas o domínio BH3, Bim e PUMA, tem utilidade potencial como biomarcadores de prognóstico em pacientes com câncer de cólon.

É necessária uma melhor compreensão do papel das proteínas que possuem somente o domínio BH3 na tumorigênese, incluindo os seus níveis de expressão e os mecanismos de inativação (SINICROPE et al., 2008).

## **2.6 Proteína p63**

A proteína p63, um membro da família p53 de fatores de transcrição nuclear, é caracterizada por diferentes capacidades de transativação de genes relatores, induzindo a apoptose, e funcionando como agente dominante negativo (PELOSI et al., 2002). Ela está envolvida em um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo a proliferação celular, sobrevivência, apoptose, desenvolvimento, diferenciação, senescência e envelhecimento (BERGHOLZ; XIAO, 2012).

Não há qualquer evidência de que p63 é um gene supressor de tumor, como TP53. O p63 também pode desempenhar um papel na replicação celular, por competição com TP53 para se ligar o DNA ou através de uma interação direta com p53 ligado ao DNA (STOCKMANN, 2011).

A proteína p63 mostra uma especificidade mais tecidual, e é encontrada com maior frequência em células basais, protegendo-as da apoptose e coordenando a sua diferenciação. Além disso, a p63 é também encontrada junto com o TP53, porém expressando diferentes isoformas, algumas das quais

atuam como ativadores transcricionais. Estas isoformas têm a capacidade para ativar p53 e induzir à apoptose e bloquear o ciclo celular (STOCKMANN, 2011).

A superexpressão de p63 em câncer humano influencia a adesão celular em vários pontos. Então, assim como p53, a p63 pode ser considerada um ponto central na rede de caminhos responsáveis para a transformação neoplásica de células epiteliais e para a progressão tumoral (GU et al., 2008).

A expressão da proteína p63 tem sido descrita em CCEs de vários tecidos, favorecendo a idéia de que a sua superexpressão pode desempenhar um papel na oncogênese. Porém, parece não estar associada com o grau de diferenciação e com outras características associadas com comportamento biológico agressivo (REIS-FILHO et al., 2002). Pelosi et al. (2002) demonstraram que, apesar da p63 estar provavelmente envolvida no desenvolvimento de carcinoma de células escamosas pulmonar, a imunorreatividade para p63 não carrega qualquer implicação prognóstica em pacientes com esta neoplasia. Em alguns carcinomas pulmonares, a imunorreatividade de p63 correlacionou-se diretamente com a fração de proliferação do tumor e, inversamente, com o grau da neoplasia.

Evidências clínicas sugerem que a p63 pode desempenhar um papel na inibição da metástase, sendo, portanto, a deficiência desta proteína um fator causal para a propagação metastática (BERGHOLZ; XIAO, 2012).

A forte expressão da p53 e p63 no estudo de Jung et al. (2006) indicou a malignidade do CCE, demonstrando que, defeitos em ambos os genes e suas vias, são essenciais para a transformação maligna de células epiteliais da conjuntiva, podendo ser marcadores úteis do CCE em conjuntiva.

Ribeiro-Silva et al. (2003) demonstraram que a expressão da p63 foi rara em carcinomas de mama de mulheres, argumentando contra um papel direto na tumorigênese mamária. No entanto, entre os dez casos positivos para p63, apenas um caso expressou a proteína p53, sugerindo que a p63 pode atuar indiretamente como um oncogene por inibir a p53. Esta hipótese também poderia explicar porque a p63 se correlaciona com vários indicadores de mau prognóstico e garante uma investigação mais aprofundada.

O acúmulo progressivo de células imunorreativas para p63 de metaplasia escamosa, displasia *in situ* e CCE invasivo pode refletir um papel importante para esta proteína no desenvolvimento desse tumor. O aumento da prevalência da imunoreatividade de p63 de pré-neoplasias (hiperplasia e metaplasia) para lesões displásicas escamosas e CCE invasivo foi observado por Pelosi et al. (2002).

Tem sido relatado que a alta expressão de p63 está associada a um fenótipo mais agressivo e a um pobre prognóstico no carcinoma de células escamosas oral em humanos (LO MUZIO et al., 2005).

De acordo com Gu et al. (2008), p63 contribui para a invasão e migração celulares no carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, porém, a função da p63 ainda é incerta e o valor prognóstico desta proteína é controverso.

### **III OBJETIVOS**

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a imunexpressão das proteínas p53, p63 e PUMA e suas possíveis contribuições quanto ao prognóstico e terapêutica no CCE corneal espontâneo de cães.

## **IV MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Amostras**

Os fragmentos tumorais avaliados foram obtidos junto ao Serviço de Oftalmologia Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto-SP, situado na cidade de São José do Rio Preto-SP, onde foram identificados seis casos, sendo cinco com diagnóstico de carcinoma de células escamosas corneal e um com diagnóstico de ceratite actínica, no período de três anos (2009-2011). Cada fragmento tumoral coletado foi encaminhado para diagnóstico histopatológico e posteriormente para ensaios de imunistoquímica para identificação das proteínas p53, p63, PUMA e citoqueratina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNESP-Araçatuba (Protocolo 2013-00808).

### **4.2 Avaliação anatomopatológica**

O diagnóstico histopatológico foi proveniente de peças cirúrgicas ou biópsia previamente fixadas em formol 10% tamponado por no mínimo 72 horas e, posteriormente, incluídos em parafina. Dos blocos parafinizados, foram obtidos fragmentos de 3 a 4 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), que foram corados rotineiramente pela coloração de H.E (Hematoxilina e Eosina) e analisados por microscopia de luz por um patologista veterinário. A graduação histológica dos tumores quanto ao grau de malignidade foi avaliada nos casos de carcinoma de células escamosas de córnea, utilizando o índice mitótico (IM) como principal referência. Contaram-se as mitoses em dez campos de grande aumento (x 40).

As imagens foram capturadas com câmera AxioCam MRc (Carl Zeiss<sup>®</sup>, Oberkochen, Alemanha) e processadas com sistema de análise de imagem pelo software Axio Vision 4.8.3 (Carl Zeiss<sup>®</sup>).

### 4.3 Imunoistoquímica

O método imunoistoquímico utilizado foi o da estreptoavidina-biotina-peroxidase. Inicialmente, realizou-se a desparafinização do tecido em xilol, à temperatura ambiente por 30 minutos, seguido por hidratação dos cortes utilizando-se concentrações decrescentes de álcool. A recuperação antigênica pelo calor foi realizada em forno micro-ondas com solução de citrato 10 mL (pH = 6.0) (2,1 g de ácido cítrico monohidratada diluídos em 1000 mL de água destilada) em duas etapas de fervura de cinco minutos cada, deixando-se o material resfriar em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água corrente e, em seguida, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de 100 mL de água oxigenada (20V) diluída em 100 mL de metanol, durante 30 minutos. Na sequência, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários com uso de diluente próprio<sup>1</sup> e diluição conforme a Tabela 1, por 18 horas a uma temperatura de 4<sup>o</sup>C em câmara úmida. Ato contínuo, as lâminas foram lavadas em solução tampão PBS (pH=7,4). A incubação com o “kit” LSAB (Dako<sup>®</sup>), que contempla o anticorpo secundário, ocorreu durante 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram submetidas à passagem em solução tampão. A revelação foi conduzida utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB)<sup>2</sup>, com sucessivas lavagens em solução tampão, água corrente e água destilada. Por fim, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina de Harrys (Dako<sup>®</sup>), 5,0 mL por lâmina e

---

<sup>1</sup> Diluente de anticorpo, DAKO<sup>®</sup>, Califórnia, USA, código S3022

<sup>2</sup> DAB líquido, DAKO<sup>®</sup>, código K3467

lavagem em água destilada. Os cortes foram desidratados em lavagens crescentes de álcool e xilol e, posteriormente, montados em resina sintética.

Como controle negativo, houve a omissão do anticorpo primário em uma amostra de CCE, realizando-se sua substituição por PBS. E como controle positivo, uma amostra de carcinoma mamário foi utilizada para todos os anticorpos. O anticorpo anti-citoqueratina (PCK-26) foi analisado com o objetivo de se confirmar a origem epitelial dos tumores.

TABELA 1- Relação dos anticorpos primário, fabricantes e diluições utilizados

<b>Ac</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>
Anti-p53	Sigma-Aldrich®	1:100
Anti-p63	Sigma-Aldrich®	1:200
Anti-PUMA	Sigma-Aldrich®	1:100
Anti-citoqueratina	Sigma-Aldrich®	1:100

#### **4.4 Avaliação microscópica da imunoistoquímica**

Na imunoistoquímica avaliou-se o número de células marcadas por campo no microscópio adotando-se dois critérios de classificação em escores, proposto por Sannino e Shousha (1994): 1) quanto à intensidade de marcação: 0 (ausente), 1+ (leve), 2+ (moderado) e 3+ (intenso); e 2) quanto à frequência de marcação: 0 (ausente), 1+ (< 10% de marcação celular), 2+ (10% a 30% de marcação celular), 3+ (30% a 70% de marcação celular) e 4+ (> 70% de marcação celular), considerando-se todo campo de tecido corado.

O perfil imunoistoquímico das lesões foi considerado como positivo quando as células apresentavam coloração acastanhada para os marcadores avaliados.

As lâminas coradas por H.E. foram utilizadas como controle em relação à observação das regiões imunomarcadas pelo anticorpos anti-p53, anti-p63 e anti-PUMA.

## V RESULTADOS

Do total de seis amostras analisadas, cinco foram diagnosticadas como carcinoma de células escamosas corneal e um como ceratite actínica. Na Tabela 2, apresenta-se a descrição das amostras coletadas e, na Tabela 3, a graduação em relação à malignidade dos casos de CCE de córnea.

TABELA 2- Distribuição das amostras tumorais coletadas em cães, segundo a idade, raça, sexo, localização e diagnóstico histopatológico. Araçatuba, 2013

<b>Amostras</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localização corneal</b>	<b>Diagnóstico histopatológico</b>
1	9	Bulldogue inglês	F	Axial	CCE
2	11	Boxer	M	Paraxial inferior	CCE
3	9	Weimaraner	F	Nasal inferior	CCE
4	13	Boxer	F	Axial	CCE
5	10	SRD	F	Temporal inferior	CCE
6	7	Boxer	F	Difusa	Ceratite actínica

TABELA 3- Descrição histológica das amostras de carcinoma de células escamosas corneal quanto ao grau de malignidade encontrado. Araçatuba, 2013

Amostras	Grau de malignidade		
	Pleomorfismo	Infiltrado inflamatório	Mitoses em 10 campos (obj. 40x)
1	Moderado	Moderado de permeio	36
2	Moderado	Moderado	9
3	Acentuado	Acentuado	21
4	Acentuado	Intenso	13
		Queratinização individual de células	
5	Acentuado	Intenso	4
		Queratinização individual de células	

Não foi observada qualquer expressão para as proteínas p53, p63 e PUMA na amostra controle, demonstrando que não há marcação imunoistoquímica quando a proteína não mutante está presente, significando atividade normal destas proteínas mencionadas. Por outro lado, marcação positiva foi observada em todas as amostras dos CCEs corneais e na ceratite actínica (Tabela 4). As proteínas p53 e p63 foram expressas com marcações nuclear e citoplasmática, e a proteína PUMA com marcação apenas citoplasmática, em 100% dos casos. Os fragmentos de tecido neoplásico apresentaram forte expressão para a citoqueratina PCK-26, confirmando, desta forma, a origem epitelial dos tumores (Figuras 2 a 4).

TABELA 4- Representação gráfica das amostras avaliadas quanto à intensidade e frequência da marcação, segundo os diferentes marcadores utilizados. Araçatuba, 2013

Amostras	p53		p63		PUMA		Citoqueratina
	I	F	I	F	I	F	
1	+1	+1	+3	+4	+1	+2	+
2	+2	+1	+3	+4	+2	+3	+
3	+1	+1	+1	+2	+1	+1	+
4	+3	+2	+3	+4	+2	+1	+
5	+1	+3	+2	+4	+1	+2	+
6	+2	+1	+1	+2	+3	+2	+

Legenda: I: intensidade, F: frequência, +: positivo/presente

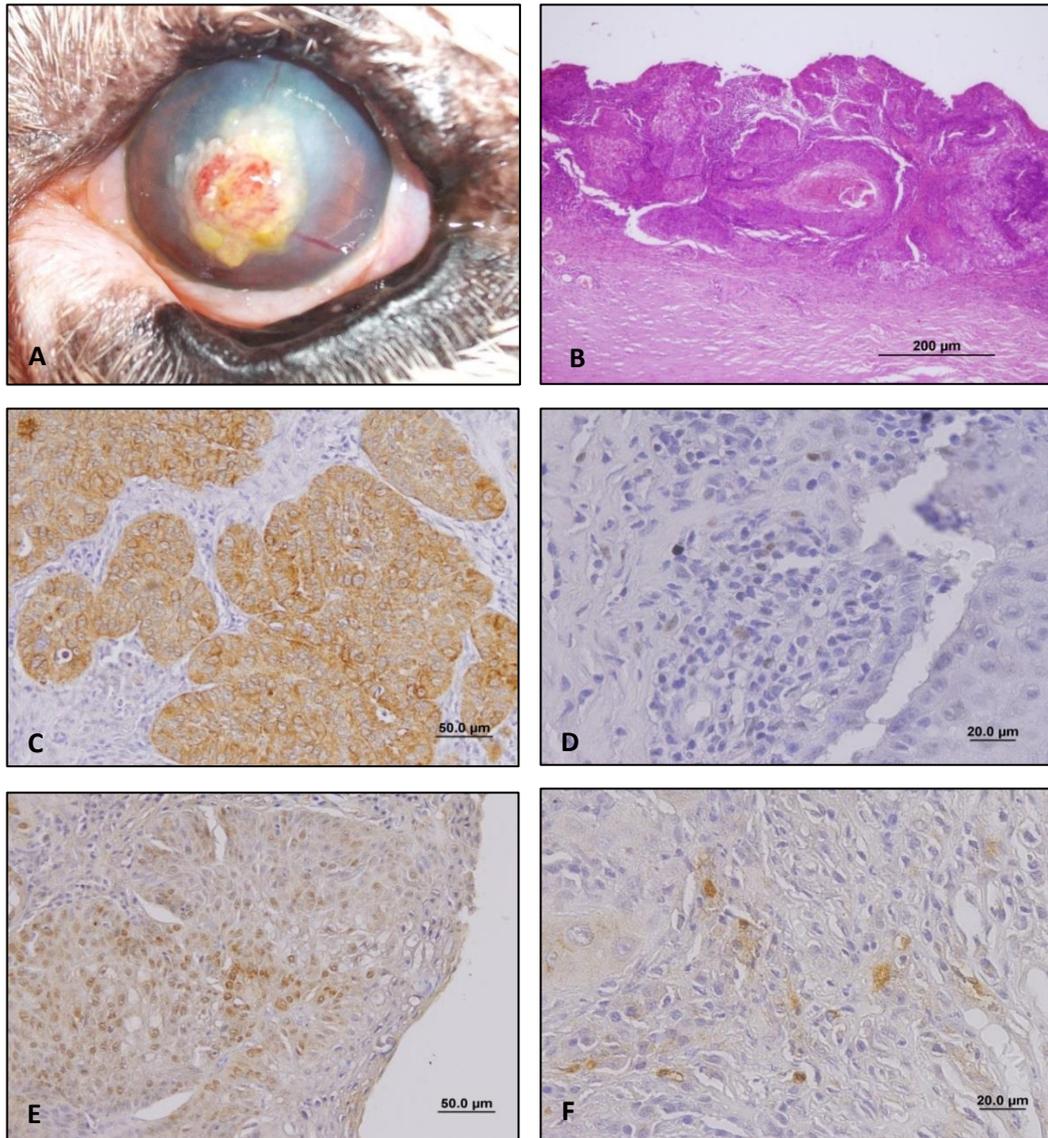


FIGURA 2- Imagem do caso representado pela amostra 1 apresentando CCE corneal axial (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 4x (B). Fotomicrografias da imunoexpressão para citoqueratina, 20x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 40x (F).

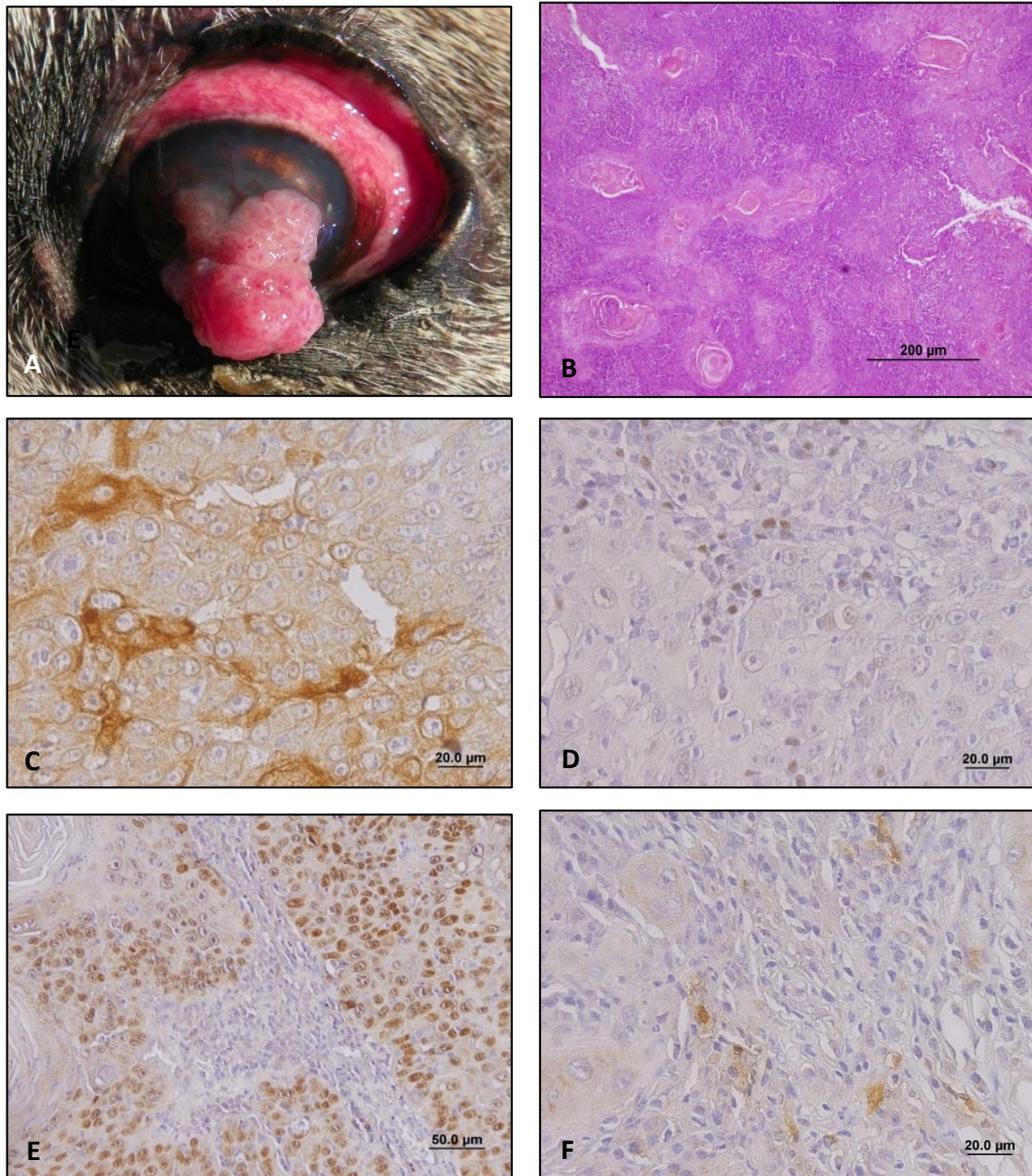


FIGURA 3- Imagem do caso representado pela amostra 4 apresentando CCE corneal axial (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 4x (B). Fotomicrografias da imunoposição para citoqueratina, 40x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 40x (F).

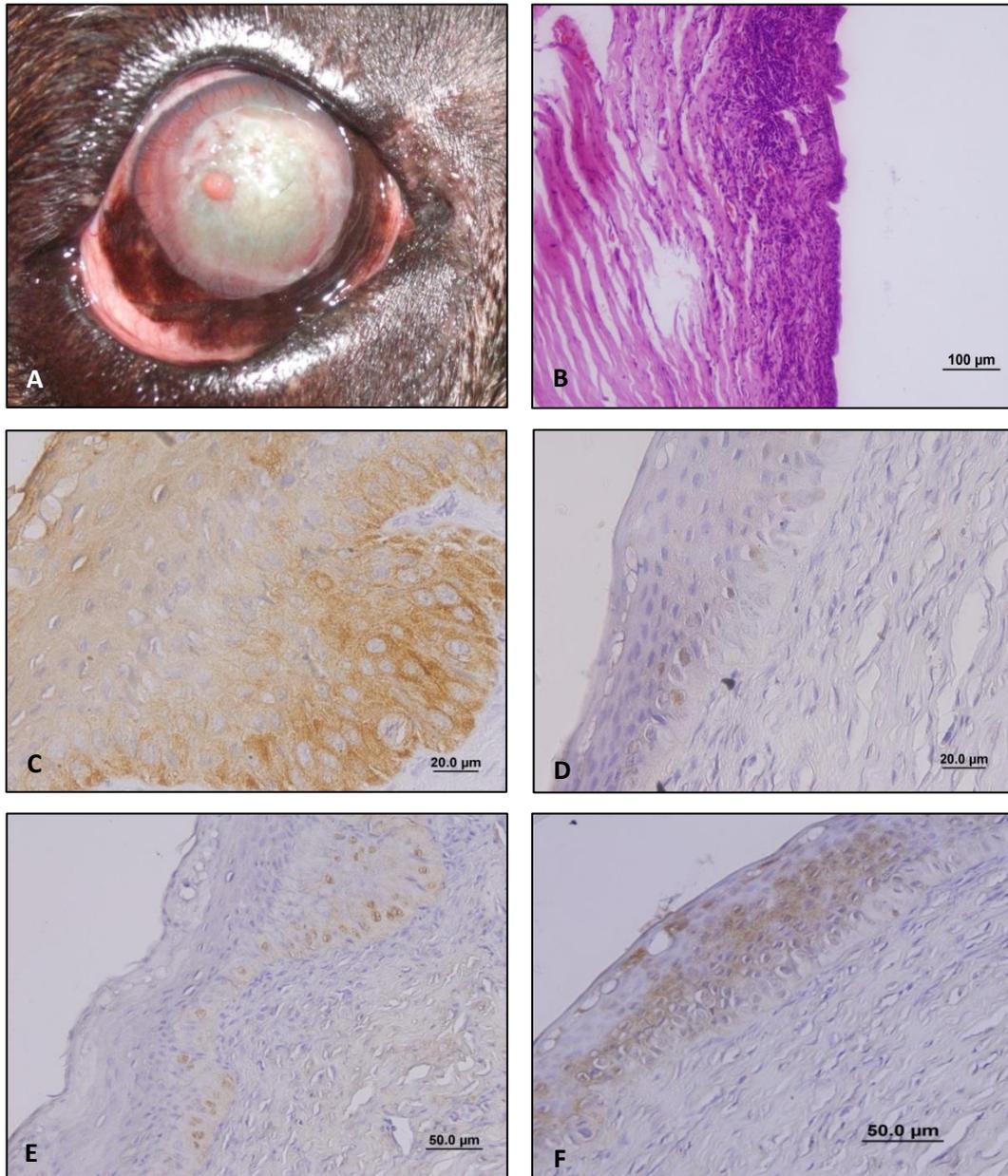


FIGURA 4- Imagem do caso representado pela amostra 6 apresentando ceratite actínica (A). Fotomicrografia do histopatológico da mesma amostra, HE, 10x (B). Fotomicrografias da imunopressão para citoqueratina, 40x (C), para a proteína p53, 40x (D); para a p63, 20x (E); e para PUMA, 20x (F).

## VI DISCUSSÃO

O diagnóstico das neoplasias oculares pode ser realizado utilizando-se a histopatologia e a imunistoquímica, entre outros métodos. Utilizamos o diagnóstico histopatológico para os tumores e a imunistoquímica por imunomarcção da citoqueratina, confirmando que se tratavam de tumores de origem epitelial.

O presente estudo demonstrou que o acúmulo anormal das proteínas p53, p63 e PUMA esteve presente no CCE corneal de cães e na ceratite actínica, porém com variação da intensidade e frequência de marcação, sugerindo a disfunção destas proteínas com provável envolvimento na carcinogênese desta neoplasia.

Uma pesquisa do banco de dados COPLOW (Comparative Ocular Pathology Lab of Wisconsin) identificou 26 casos de CCE de córnea diagnosticados entre 1978-2008, e observou-se uma forte predileção em raças braquicefálicas com idade média de 9,6 anos (DREYFUS et al., 2011); e nosso trabalho corroborou os dados encontrados nesse estudo.

A expressão aberrante da proteína p53 tem sido descrita no carcinoma de células escamosas conjuntival (SIRONI et al., 1999) e, recentemente, Lopes et al. (2010) verificaram uma elevada presença e expressão do gene supressor de tumor TP53 e do oncogene c-Myc nos tumores de anexos oculares de cães, utilizando as técnicas de PCR, RT-PCR, PCR ELISA e RT-PCR ELISA; porém são raros os estudos sobre a função desse gene ou de seu produto no CCE corneal de cães. Da mesma maneira que Montiani-Ferreira et al. (2008) observaram, em um caso de CCE corneal canino, a forte expressão da p53 por imunistoquímica, sugerindo que uma mutação do TP53 pode ter causado este CCE primário da córnea. Em nosso estudo também foi encontrada a expressão desta proteína p53 em todas as cinco amostras. Já Takiyama et al. (2010) relataram dois casos de CCE corneal em cães que não expressaram a proteína p53.

A radiação ultravioleta (UV) é mutagênica para o gene supressor de tumor TP53, e a superexpressão desse gene é provavelmente uma consequência da exposição à radiação ultravioleta (MONTIANI-FERREIRA et al., 2008). Essa radiação é considerada o principal agente cancerígeno associado ao CCE. Os cães, utilizados em nosso estudo, residiam na região de São José do Rio Preto- São Paulo, onde os níveis de raios UV são substancialmente elevados, chegando a atingir valores extremos que oscilam entre os graus 12 e 13, em uma escala de zero a 14. A partir do nível 8 na escala, o índice já é considerado muito alto e, ao chegar no grau 11, passa a ser identificado como extremo (INPE, 2013), além de uma temperatura média anual de 23,6°C (CEPAGRI, 2013). Esses dados demonstram que a mutação deste gene TP53 pela radiação ultravioleta pode estar envolvida no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas em cães, como também relatou Montiani-Ferreira et al. (2008) ao demonstrarem que a mutação da proteína p53, pode ter surgido devido a uma mutação do gene TP53 pela radiação ultravioleta, uma vez que o caso relatado refere-se a um cão oriundo de uma região com grande índice de radiação solar.

Dreyfus et al. (2011) indicaram que a conformação dos olhos dos braquicefálicos, fortemente representados nesse estudo, certamente aumenta a exposição a qualquer irritante ambiental, incluindo a luz UV, o que pode ter contribuído para a mutação do gene TP53. A luz UV pode desempenhar um papel contributivo, como acontece em outras espécies (bovinos, equinos, seres humanos) e tem sido implicada pela expressão positiva da p53.

A constatação da expressão da p53 na amostra com diagnóstico de ceratite actínica, pode sugerir um evento precoce na progressão da displasia para o carcinoma de células escamosas, apesar de ter sido encontrada em um único caso. Justificando essa possibilidade, Coulter et al. (1995) aventaram a mesma hipótese quando da ocorrência dessa expressão no carcinoma de células escamosas humano, suportando a possibilidade de que a mutação de p53 é um evento molecular no estágio inicial do desenvolvimento desta neoplasia.

Assim como a p53, a proteína PUMA é importante na apoptose, sendo um alvo principal de p53 e desempenha um papel-chave, com capacidade para ligar e inibir as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (CHIPUK; GREEN, 2009; MAXIMOV; MAXIMOV, 2008). A expressão de PUMA foi observada em todas as amostras nesse estudo, porém com marcação apenas citoplasmática. A escassez de trabalhos relacionando a função de PUMA com a patogênese do carcinoma ocular é notória; porém, Lopes (2012) demonstrou, nas amostras de carcinomas de células escamosas de anexos oculares de cães, uma super expressão de PUMA, o que relaciona esse achado com a saída do citocromo-c, dando início ao processo de apoptose.

De acordo com Callus et al. (2008), PUMA pode causar a apoptose na ausência de p53. Em seu estudo, Yoo et al. (2007) não encontraram qualquer associação significativa de expressão da PUMA com a expressão da p53, o que sugere que podem haver outros mecanismos envolvidos na expressão desta proteína, além da transativação da p53. Aqui pudemos notar que todas as amostras expressaram, tanto p53, quanto PUMA, o que sugere que há alguma relação entre ambas.

Não há qualquer evidência de que p63 é um gene supressor de tumor como o TP53, porém ela pode desempenhar um papel na replicação celular, por competir com TP53 para se ligar ao DNA ou através de uma interação direta com p53 ligado ao DNA e, por isso, pode ter importância no desenvolvimento das neoplasias. Adjudoriamente, a sua capacidade para ativar p53, induzir à apoptose e bloquear o ciclo celular deve ser considerada (STOCKMANN, 2011). A expressão da proteína p63 tem sido descrita em CCEs de vários tecidos, favorecendo a idéia de que a sua superexpressão pode desempenhar um papel na oncogênese desta neoplasia (REIS-FILHO et al., 2002); mas não há pesquisas demonstrando sua função no carcinoma escamoso corneal. No presente estudo, a expressão da proteína p63 foi mais intensa em todas as amostras, quando comparada às outras proteínas avaliadas. Kaufmann et al. (2001) relataram que a detecção de p63 no carcinomas de células escamosas do homem, aparentemente, não depende do

grau do tumor. Reis-Filho et al. (2002) informaram que, provavelmente, a p63 não está associada ao grau de diferenciação ou ao comportamento biológico agressivo; da mesma forma que encontrado aqui, onde não foi possível relacioná-la com o grau de malignidade encontrado no CCE corneal.

De acordo com Bergholz e Xiao (2012), evidências clínicas sugerem que a p63 pode desempenhar um papel na inibição da metástase, sendo a deficiência desta proteína um fator causal para a propagação metastática. Dos seis cães utilizados neste estudo, em quatro deles foram realizados exames laboratoriais e de imagens, não sendo encontrada qualquer evidência de metástases, porém essa correlação descrita pelos autores requer melhores investigações.

Pelosi et al. (2002) demonstraram que o acúmulo progressivo de células imunorreativas para p63 na metaplasia escamosa, displasia *in situ* e CCE invasivo pode indicar um papel importante para esta proteína no desenvolvimento do CCE, pois foi observado aumento da prevalência da imunorreatividade de p63 de pré-neoplasias (hiperplasia e metaplasia) para lesões displásicas escamosas e CCE invasivo. Diferentemente deste trabalho citado, não encontramos uma menor expressão da p63 na ceratite actínica, uma lesão pré neoplásica, quando comparada ao carcinoma escamoso. Porém, trata-se da análise de apenas uma amostra.

O índice mitótico (IM) é uma medida indireta da proliferação celular baseado na quantificação de figuras de mitose em uma amostra histopatológica. Tem sido demonstrado que o IM é um forte elemento pré-ditor do resultado para uma variedade de cânceres humanos e de cães, incluindo os carcinomas de tireóide, e de mama, sarcomas, entre outros, podendo ser um indicador de prognóstico adicional (ROMANSIK et al., 2007).

As amostras aqui utilizadas foram graduadas quanto a sua malignidade, utilizando o IM como principal referência e, diferentemente de Lopes (2012), que encontrou uma alta expressão das proteínas p53 e p63, principalmente nas amostras que foram diagnosticadas com um maior grau de malignidade como os carcinomas, em nosso trabalho, não foi observada relação entre maior

índice mitótico e, portanto, maior malignidade, com uma maior expressão de qualquer uma das proteínas analisadas. Desta forma, não foi possível correlacionar a taxa de expressão da proteína com o grau de malignidade tumoral do CCE corneal de cães.

Todos os nossos casos de CCE apresentaram marcação tanto nuclear, quanto citoplasmática, para p53 e p63, e apenas citoplasmática para PUMA. A marcação citoplasmática com o anticorpo p53, apesar de não ser específica, é considerada verdadeira, por alguns autores. A expressão citoplasmática aumentada da p53 é consequência do sequestro da proteína alterada neste compartimento celular, o que proporciona sua inativação relacionada ao processo neoplásico. A expressão citoplasmática dessa proteína pode estar relacionada a diferenças na regulação do ciclo celular, que implicam no aumento do risco potencial de invasão do tumor. Acredita-se que a marcação citoplasmática é mais frequente do que a literatura informa. Este fato indica uma nova via de sinalização para estes tumores, que pode ser ou não uma forma de transformação como característica de um tumor mais agressivo (TEIXEIRA et al., 2011). Quanto à expressão citoplasmática das proteínas p63 e PUMA, nenhuma referência foi encontrada na literatura e, por isso, outros estudos são necessários para elucidar tais achados. O mesmo pode ser extrapolado para os CCEs corneais, em que os estudos, ainda, são poucos na literatura.

Devido à grande importância da via p53, a compreensão dos mecanismos da função desta proteína é um dos principais desafios atuais, e tal conhecimento pode fornecer novos alvos e abordagens para a manipulação terapêutica desta via no tratamento do câncer. O desafio no futuro será utilizar tais conhecimentos, assim como de outras proteínas, para desenvolver estratégias altamente eficazes, bem como, novos fármacos para prevenção e tratamento do câncer, com menores efeitos colaterais (BAI; ZHU, 2006).

## VII CONCLUSÃO

- A expressão das proteínas p53, p63 e PUMA, pela imunistoquímica, foi presente nos CCEs corneal de cães sugerindo que são importantes no desenvolvimento desta neoplasia.
- A expressão das proteínas estudadas não está relacionada à gravidade do carcinoma escamoso corneal, já que seu grau de expressão não se relacionou a agressividade do tumor.
- É possível que haja uma forte relação da exposição à radiação solar e a mutação do gene TP53 com perda da função de sua proteína, podendo ser um evento importante na carcinogênese do CCE corneal de cães.

## REFERÊNCIAS

ALMOG, N.; ROTTER, V. Involvement of p53 in cell differentiation and development. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1333, n.1, p.F1–F27, 1997.

ARRUDA, J.T.; BORDIN, B.M.; MIRANDA, L.C.B.; MAIA, D.L.M.; MOURA, K.K.V.O. Proteína p53 e o câncer: controvérsias e esperanças. **Estudos, Goiânia**, v. 35, n. 1/2, p. 123-141, 2008.

ARYA, S.K.; MALIK, A.; SAMRA, S.G.; GUPTA, S.; GUPTA, H.; SOOD, S. Squamous cell carcinoma of cornea. **International Ophthalmology**, v.28, n.5, p.379-82, 2008.

BAI, L.; ZHU, W. p53: Structure, function and therapeutic applications. **J. Cancer Molecular**, v.2, n.4, p.141-153, 2006.

BALLALAI, P.L.; GOMES, J.A.P.; SANTOS, M.S.; FREITAS, D.; ERWENNE, C.M.; RIGUEIRO, M. Uso de mitomicina C tópico no tratamento da neoplasia intra-epitelial córneo-conjuntival e carcinoma espinocelular conjuntival – Resultados preliminares. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, n.5, p.559-562, 2003.

BERGHOLZ, J.; XIAO, Z.X. Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression. **Cancer Microenvironment**, v.5, n.3, p.311-322, 2012.

BERNAYS, M.E.; FLEMMING, D.; PEIFFER, R.L. Primary corneal papilloma and squamous cell carcinoma associated with pigmentary keratitis in four dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.214, n.2, p.215-217, 1999.

BUSSE, C.; SANSOM, J.; DUBIELZIG, R.R.; HAYES, A. Corneal squamous cell carcinoma in a Border Collie. **Veterinary Ophthalmology**, v.11, n.1, p.55-58, 2008.

CALLUS, B.A.; EKERT, P.G.; HERAUD, J.E.; JABBOUR, A.M.; KOTEVSKI, A.; VINCE, J.E.; SILKE, J.; VAUX, D.L. Cytoplasmic p53 is not required for PUMA-induced apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v.15, p.213-219, 2008.

CASTAÑEDA, D.B.; GONZALEZ, P.A.; ORTEGA, M.R.R.; TORRES, H.I.Z. Revision bibliografica de p53: vias de senalizacion y papel en el proceso de carcinogenesis. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial**, v.7, n.2, p.37-54, 2007.

CEPAGRI. Centro de pesquisas metereológicas e climáticas aplicadas à agricultura. **Clima dos municípios paulistas**. Disponível em < [http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima\\_muni\\_559.html](http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_559.html) >. Acesso em: 14 ago. 2013.

CHARI, N.S.; PINAIRE, N.L.; THORPE, L.; MEDEIROS, L.J.; ROUTBORT, M.J.; MCDONNELL, T.J. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. **Apoptosis**, v.14, n.4, p.336-347, 2009.

CHEN, Y.; QIAN, H.; WANG, H.; ZHANG, X.; FU, M.; LIANG, X.; MA, Y.; ZHAN, Q.; LIN, C.; XIANG, Y. Ad-PUMA sensitizes drug-resistant choriocarcinoma cells to chemotherapeutic agents. **Gynecologic Oncology**, v.107, n.3, p.505-512, 2007.

CHIPUK, J.E.; GREE, D.R. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. **Cell Cycle**, v.8, n.17, p.2692-2696, 2009.

COULTER, L.K.; WOLBER, R.; TRON, V.A. Site-specific comparison of p53 immunostaining in squamous cell carcinomas. **Human Pathology**, v.26, n.5, p.531-533, 1995.

DE BRUIN, E.C.; MEDEMA, J.P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Review.**, v.34, n.8, p.737-749, 2008.

DUBIELZIG, R.R. Ocular neoplasia in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.20, n.3, p.837-848, 1990.

DREYFUS, J.; SCHOBERT, C.S.; DUBIELZIG, R.R. Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. **Veterinary Ophthalmology.**, v.14, n.3, p.161-168, 2011.

FARIA, M.H.G., RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene C-MYC no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.52, n.2, p.165-171, 2006.

FARNEBO, M.; BYKOV, V.J.; WIMAN, K.G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v.396, n.1, p.85-89, 2010.

GALERA, P.D.; MARTINS, E.A.N. Ceratectomia superficial em carcinoma de células escamosas ocular em bovino Simental: Relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.585-588, 2001.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GU, X.; COATES, P.J.; BOLDRUP, L.; NYLANDER, K. p63 contributes to cell invasion and migration in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Letters**, v.263, n.1, p.26-34, 2008.

INPE. Divisão de Satélites e Sistemas Ambientais. **Índice Ultravioleta**. São José do Rio Preto. 2013. Disponível em < <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/>>. Acesso em: 14 ago. 2013.

JEFFERS, J.R.; PARGANAS, E.; LEE, Y.; YANG, C.; WANG, J.L.; BRENNAN, J.; MACLEAN, K.H.; HAN, J.; CHITTENDEN, T.; IHLE, J.N.; MCKINNON, P.J.; CLEVELAND, J.L.; ZAMBETTI, G.P. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. **Cancer Cell**, v.4, n.4, p.321-328, 2003.

JIANG, W.; ANANTHASWAMY, H.N.; MULLER, H.K.; KRIPKE, M.L. P53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. **Oncogene**, v.18, n.29, p.4247-4253, 1999.

JUNG, S.M.; LIN, H.C.; CHU, P.H.; WU, H.H.; SHIU, T.F.; HUANG, S.L.; LAI, C.H. Expression of cell cycle-regulatory proteins, MIB-1, p16, p53, and p63, in squamous cell carcinoma of conjunctiva: not associated with human papillomavirus infection. **Virchows Archive**, v.448, n.3, p.301-305, 2006.

KAPS, S.; RICHTER, M.; PHILIPP, M.; BART, M.; EULE, C.; SPIESS, B.M. Primary invasive ocular squamous cell carcinoma in a horse. **Veterinary Ophthalmology**, v.8, n.3, p.193-197, 2005.

KARASAWA, K.; MATSUDA, H.; TANAKA, A. Superficial keratectomy and topical mitomycin C as therapy for a corneal squamous cell carcinoma in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, n.4, p.208-210, 2008.

KASTAN, M.B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R.W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Research**, v.51, p.6304-6311, 1991.

KAUFMANN, O.; FIETZE, E.; MENGS, J.; DIETEL, M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. **American Journal of Clinical Pathology**, v.116, n.6, p.823-830, 2001.

LATIMER, K.S.; KASWAN, R.L.; SUNDBERG, J.P. Corneal squamous cell carcinoma in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.11, p.1430-1432, 1987.

LEE, D.; KIM, C.; ZHANG, L.; LEE, Y.J. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v.75, n.10, p.2020-2033, 2008.

LIMA, C.G.M.G.; VELOSO, J.C.B.; TAVARES, A.D.; JUNGMAN, P.; VASCONCELOS, A.A. Método citológico e histopatológico no diagnóstico das lesões da conjuntiva: estudo comparativo. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.68, n.5, p.623-626, 2005.

LO MUZIO, L.; SANTARELLI, A.; CALTABIANO, R.; RUBINI, C.; PIERAMICI, T.; TREVISIOL, L.; CARINCI, F.; LEONARDI, R.; DE LILLO, A.; LANZAFAME, S.; BUFO, P.; PIATTELLI, A. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v.36, n.2, p.187-194, 2005.

LOPES, A.A., OLIVEIRA, A.M.; PRADO, C.B.C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.2, n.2, 2002. Disponível em:

<<http://eduep.uepb.edu.br/rbct/sumarios/pdf/genes.pdf>>. Acesso em 25 out. 2010.

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

LOPES, R.A.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C.R.; ANDRADE, A.L. Occurrence and expression of p53 suppressor gene and c-Myc oncogene in dog eyelid tumors. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.2, p.69-75, 2010.

MAXIMOV, G.K.; MAXIMOV, K.G. The role of p53 tumor-suppressor protein in apoptosis and cancerogenesis. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v.22, n.2, p664-668, 2008.

MILLER, P.E.; DUBIELZIG, R.R. Ocular tumors. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. **Small animal clinical oncology**. 4ed. Saunders Elsevier, 2007, p.686-698.

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

MONTIANI-FERREIRA, F.; WOUK, A.F.P.F.; LIMA, A.S.; KLEINER, J.A.; MUZOLON, P. Neoplasias oculares. In: DALECK, C.R.; De NARDI, A.B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. Roca, 2009, cap. 17, p. 293-312.

MUSTATA, G.; LI, M.; ZEVOLA, N.; BAKAN, A.; ZHANG, L.; EPPERLY, M.; GREENBERGER, J.S.; YU, J.; BAHA, I. Development of Small-Molecule PUMA

Inhibitors for Mitigating Radiation-Induced Cell Death. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.11, n.3, p.281-290, 2011.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews. Cancer.**, v.4, n.8, p.592-603, 2004.

PELOSI, G.; PASINI, F.; STENHOLM, O.C.; PASTORINO, U.; MAISONNEUVE, P.; SONZOGNI, A.; MAFFINI, F.; PRUNERI, G.; FRAGGETTA, F.; CAVALLON, A.; ROZ, E.; IANNUCCI, A; BRESAOLA, E.; VIALE, G. p63 immunoreactivity in lung cancer: yet another player in the development of squamous cell carcinomas? **Journal of Pathology.**, v.198, n.1, p.100-109, 2002.

POPOV, Z.; HOZNEK, A.; COLOMBEL, M.; BASTUJI-GARIN, S.; LEFRERE-BELDA, M.A.; BELLOT, J.; ABBOH, C.C.; MAZEROLLES, C.; CHOPIN, D.K. The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. **Cancer.**, v.80, n.8, p.1472-1481, 1997.

REIS-FILHO, J.S.; TORIO, B.; ALBERGARIA, A.; SCHMITT, F.C. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. **Journal of Cutaneous Pathology.**, v.29, n.9, p.517-523, 2002.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZAMBELLI, R.L.N.; BRITTO, G.S.; ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v.127, n.3, p.336-340, 2003.

RIEDL, S.J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.5, n.11, p.897-907, 2004.

ROMANSIK, E.M.; REILLY, C.M.; KASS, P.H.; MOORE, P.F.; LONDON, C.A. Mitotic Index Is Predictive for Survival for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. **Veterinary Pathology**, v.44, n.3, p.335-341, 2007.

SANNINO, P.; SHOUSHA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **Journal of Clinical Pathology**, v.47, n.1, p.90-92, 1994.

SINICROPE, F.A.; REGO, R.L.; OKUMURA, K.; FOSTER, N.R.; O'CONNELL, M.J.; SARGENT, D.J.; WINDSCHITL, H.E. Prognostic Impact of Bim, Puma, and Noxa Expression in Human Colon Carcinomas. **Clinical Cancer Research**, v.14, n.18, p.5810-5818, 2008.

SIROMA, M.S.; BARACAT, F.F. Associação entre a presença da proteína p53 e o grau de diferenciação em carcinomas ductais invasivos de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, n.5, p.298-303, 2006.

SIRONI, G.; RICCABONI, P.; MERTEL, L.; CAMMARATA, G.; BROOKS, D.E. P53 protein expression in conjunctival squamous cell carcinomas of domestic animals. **Veterinary Ophthalmology**, v.2, n. 4, p.227-231, 1999.

STOCKMANN, D.; FERRARI, H.F.; ANDRADE, A.L.; CARDOSO, T.C.; LUVIZOTTO, M.C. Detection of the tumor suppressor gene TP53 and expression of TP53, Bcl-2 and p63 proteins in canine transmissible venereal tumors. **Veterinary Comparative Oncology**, v.9, n.4, p.251-259, 2011.

SUN, Q.; SAKAIDA, T.; YUE, W.; GOLLIN, S.M.; YU, J. Chemosensitization of head and neck cancer cells by PUMA. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.6, n.12, p.3180-3188, 2007.

TAKIYAMA, N.; TERASAKI, E.; UECHI, M. Corneal squamous cell carcinoma in two dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v.13, n.4, p.266-269, 2010.

TEIXEIRA, M.J.D.; SOBRAL, A.P.V.; ABREUE-LIMA, M.C.; MAIA, F.C.L.; CHRISTILIS, M.; SOUZA, D.M.B.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. Avaliação da superexpressão da proteína p53 e das mutações no éxon 8 do gene TP53 em carcinomas mamários caninos e glândulas normais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.521-526, 2011.

WARD, D.A.; LATIMER, K.S.; ASKREN, R.M. Squamous cell carcinoma of the corneoscleral limbus in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.10, p.1503-1506, 1992.

WEBB, J.L.; BURNS, R.E.; BROWN, H.M.; BRUCE, E.L.; KOSAREK, C.E. Squamous cell carcinoma. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**, v.31, n.3, p.133-142, 2009.

WERNER, P.R.; CHIQUITO, M.; PACHALY, J.R.; FERREIRA, F.M. Neoplasias oculares diagnosticadas em animais do sul do Paraná, Brasil. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v.1, n.1, p.13-21, 1998.

WHITE, A.W.; WESTWELL, A.D.; BRAHEMI, G. Protein-protein interactions as targets for small-molecule therapeutics in cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.10, p.e8, 2008. doi: 10.1017/S1462399408000641.

WILCOCK, B.P. Eye, eyelids, conjunctiva, and orbit. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. Fourth edition. Mosby Elsevier. Chapter 20, p.1349-1413, 2007.

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

YEE, K.S.; VOUSDEN, K.H. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA. **Apoptosis**, v.13, n.1, p.87-95, 2008.

YOO, N.J.; LEE, J.W.; JEONG, E.G.; LEE, S.H. Immunohistochemical analysis of pro-apoptotic PUMA protein and mutational analysis of PUMA gene in gastric carcinomas. **Digestive and Liver Disease.**, v.39, n.3, p.222-227, 2007.

YU, J. PUMA Kills Stem Cells to Stall Cancer? **Molecular Cell Pharmacology**, v.1, n.3, p.112-118, 2009.

YU, J.; ZHANG, L. No PUMA, no death: Implications for p53-dependent apoptosis. **Cancer Cell**, v.4, n.4, p.248-249, 2003.

YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.331, n.3, p.851-858, 2005.

YU, J.; ZHANG, L. PUMA, a potent killer with or without p53. **Oncogene**, v.27, n.1, p.71-83, 2008.

YU, J.; ZHANG, L.; HWANG, P.M.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. PUMA Induces the Rapid Apoptosis of Colorectal Cancer Cell. **Molecular Cell**, v.7, n.3, p.673-682, 2001.