

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO
mTOR EM CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA
ESPINOCELULAR CUTÂNEO EM CÃES E GATOS**

ALANA LUCENA OLIVEIRA

Botucatu - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO
mTOR EM CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA
ESPINOCELULAR CUTÂNEO EM CÃES E GATOS**

ALANA LUCENA OLIVEIRA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Oliveira, Alana Lucena.

Expressão de proteínas da via de sinalização do mTOR em ceratose actínica e carcinoma espinocelular cutâneo em cães e gatos / Alana Lucena Oliveira. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Capes: 50500007

1. Imuno-histoquímica. 2. Anticorpos monoclonais.
3. Carcinoma de células escamosas. 4. Proteínas quinases S6 ribossômicas. 5. Veterinária de pequenos animais.

Palavras-chave: p-4E-BP1; CCEs; Imuno-histoquímica; S6K1 .

Título da Tese: Expressão de proteínas da via de sinalização do mTOR em ceratose actínica e carcinoma espinocelular cutâneo em cães e gatos

Impacto científico esperado: Compreender de como a expressão da via mTOR pode impactar na ceratose actínica e carcinoma espinocelular cutâneo em cães e gatos correlacionando essas diferenças.

Impacto social esperado: Desenvolvimento de outras opções de tratamento, especialmente para cães e gatos com ceratose actínica e carcinoma de células escamosas. Conforme a descrição, essa tese se adequa no terceiro ODS da ONU que propõe assegurar uma vida saudável e o bem-estar.

Impacto econômico: O tratamento efetivo das alterações de ceratose actínica e carcinoma de células escamosas pode reduzir os recursos financeiros destinados ao manejo do paciente.

Nome do autor: ALANA LUCENA OLIVEIRA

Título: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO mTOR EM CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR CUTÂNEO EM CÃES E GATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ– UNESP – Botucatu, SP.

Dra. Aparecida Vitória Gonçalves de Souza

Membro da banca

Doutorado pelo Departamento Anestesiologia FMB Botucatu – UNESP – Botucatu

Dra. Carolina Lechinski de Paula

Membro da banca

Doutorado pelo Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ-UNESP/Botucatu/SP

Dra. Denise Cláudia Tavares

Membro da banca

Medicina Veterinária - Universidade Paulista – Unip - Campus Bauru

Dra. Noeme Sousa Rocha

Membro da banca

Patologia Veterinária – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 25 de setembro de 2024.

“Senhor, fazei de mim um instrumento de vossa paz. Onde houver ódio, que eu leve o amor. Onde houver ofensa, que eu leve o perdão. Onde houver discórdia, que eu leve a união. Onde houver dúvida que eu leve a fé. Onde houver erro, que eu leve a verdade. Onde houver desespero, que eu leve a esperança. Onde houver tristeza, que eu leve a alegria. Onde houver trevas, que eu leve a luz. Ó, Mestre, fazei que eu procure mais consolar que ser consolado; compreender que ser compreendido; amar que ser amado. Pois é dando que se recebe, é perdoando que se é perdoado e é morrendo que se vive para a vida eterna. Amém”.

Oração à São Francisco de Assis

DEDICATÓRIA

Aos meus pais João Reis de Oliveira e Carmem Lúcia Martins Lucena Oliveira, minha irmã Luma Lucena Oliveira e meu marido Ricardo Hideaki Miyajima por acreditarem na minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me permitir a vida com sabedoria e discernimento.

Aos meus pais João Reis de Oliveira, Carmem Lúcia Martins Lucena Oliveira e minha irmã Luma Lucena Oliveira, agradeço por sempre acreditarem e apoiarem a minha jornada de vida.

Ao meu marido Ricardo Hideaki Miyajima, que durante esse período sempre me fortaleceu e esteve ao meu lado, mesmo nos momentos com muitas dificuldades e imprevistos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves pelo apoio, carinho, ensino e amizade. Seu acolhimento foi fundamental nessa jornada, tenho você como exemplo de pesquisador.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram nessa jornada em todos os momentos especialmente Annalú Pinton Ferreira, Mayara Travalini de Lima e Woner Mion.

Ao grupo de pesquisa do laboratório de micologia que esteve comigo desde minha iniciação na pesquisa, durante o mestrado até os dias de hoje. Agradeço por toda a ajuda e amizade, em especial ao Hans Garcia Garces, Gabriel Gasparini Camargo, Ana Carolina do Prado, Danielle Hamae Yamauchi, Cauê Bastos Tertuliano dos Santos e Arthur Bibiano de Vascelos.

A todos os orientados do professor Carlos Eduardo: Natalia Camargo Faraldo, Fernanda Barthelson Carvalho de Moura e Luiz Guilherme Dercore Benevenuto que tornaram o Laboratório de Patologia um lugar de muita aprendizagem.

Aos meus pets que me permitem lembrar todos os dias a razão de ter escolhido a Medicina Veterinária e que me motivam a ser sempre uma profissional melhor.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. ESTUDO RETROSPECTIVO DE 304 CASOS DE CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES E GATOS: 2008 – 2024

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes caninos avaliados no estudo referente a coloração da pelagem e localização da lesão referente a quantidade analisada.....26

TABELA 2. Informações clínicas dos pacientes felinos avaliados no estudo referente a coloração da pelagem e localização da lesão referente a quantidade analisada.....30

Capítulo 2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE

DE FELINOS

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes avaliados no estudo: idade, sexo, raça, coloração da pelagem, localização da lesão, e classificação morfológica.....57

Capítulo 3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS SELECIONADAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR NA ÁREA DE TRANSIÇÃO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes caninos avaliados no estudo: idade, sexo, raça, coloração da pelagem, localização da lesão, e classificação morfológica.....77

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA.....	03
FIGURA 1. Histopatologia da pele normal apresentando as camadas que compõe a epiderme e derme (40x). Fonte: arquivo pessoal (2024).....	04
FIGURA 2. Descrição da via mTOR/4E-BP1/eIF4E. Fonte: criado com BioRender.com. (2024).....	06
FIGURA 3. A. Canino apresentando eritema em região abdominal com discreta escarificação e disqueratose. B. Canino apresentando lesão ulcerada eritematosa e gomosa. Fonte: arquivo pessoal (2024).....	08
FIGURA 4. Felino apresentando ceratose actínica com envelopamento de pinas com eritema e disqueratose. B. Felino apresentando lesão ulcerada em plano nasal. Fonte: arquivo pessoal (2024).....	09
FIGURA 5. A. Citologia de paciente felino apresentando CCEs (20x). B. Citologia de paciente canino apresentando CCEs (40x), Fonte: arquivo pessoal (2024).....	10
FIGURA 6. A. Felino apresentando pontos de sutura após realização de biópsia e coleta de três fragmentos com punch. B. Conchectomia parcial em felino C. Biópsia excisional de nódulos em região abdominal de canino. D. Biópsia da região facial de canino com coleta de dois fragmentos. Fonte: arquivo pessoal (2024).....	11
FIGURA 7 A. Histopatológico do paciente felino mostrando presença de pérolas de ceratina (10x). B. Histopatológico de paciente canino com presença de ceratinócitos com pérolas de ceratina (10x). C. Histopatológico do paciente felino com carcinoma moderadamente diferenciado (10x). D. Histopatológico de paciente canino com carcinoma moderado diferenciado (10x). E. Hispatológico de paciente felino com presença de carcinoma pouco diferenciado (40x). F. Histopatológico de paciente canino com carcinoma pouco diferenciado. Fonte: arquivo pessoal (2024).....	13
FIGURA 8. A. Imunoreatividade de S6K1em amostra de paciente felino apresentando carcinoma espinocelular (10x). B. Imunoreatividade de p-4E-BP1 em amostra de paciente felino apresentando carcinoma espinocelular (10x). Fonte: arquivo pessoal (2024).....	15
Capítulo 1. ESTUDO RETROSPECTIVO DE 304 CASOS DE CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES E GATOS: 2008 – 2024	
FIGURA 1. A. Sobrevida de paciente caninos com diferenças dos carcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados.....	28
FIGURA 2. Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier estimando a sobrevivência de cães em relação a classificação do CCEs.....	29
FIGURA 3. Sobrevida de paciente felinos com diferenças dos carcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados, demonstrado diferença estatística $p < 0,05$ pelo teste de Letras minúsculas comparam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$	32
FIGURA 4. Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier estimando a sobrevivência de felinos em relação a classificação do CCEs.....	32

Capítulo 2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE FELINOS

- FIGURA 1. A. Relação entre os felinos e o sexo B. Relação entre a quantidade de felinos e característica da pelagem.....46
- FIGURA 2. A. relação entre felinos e a localização das lesões. B. Principais raças de felinos apresentados.....46
- FIGURA 3. A. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores S6K1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma B. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores p-4E-BP1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma. Letras minúsculas comparam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$47
- FIGURA 4. A. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma pouco diferenciado. B. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma moderadamente diferenciado. C. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma bem diferenciado. Letras minúsculas comparam os marcadores segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$48
- FIGURA 5. Análise quantitativa através do score conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador S6K1. Fonte: arquivo pessoal (2024).....49
- FIGURA 6. 6. Análise quantitativa através do score conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador p-4E-BP1. Fonte: arquivo pessoal (2024).....50

Capítulo 3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS SELECIONADAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR NA ÁREA DE TRANSIÇÃO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES

- FIGURA 1. A. Relação entre os cães e o sexo B. Relação entre a quantidade de cães e característica da pelagem.....66
- FIGURA 2. 2. A. relação entre cães e a localização das lesões. B. Principais raças de cães apresentados.....67
- FIGURA 3. A. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores S6K1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma B. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores p-4E-BP1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma. Letras minúsculas comparam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$68
- FIGURA 4. A. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma pouco diferenciado. B. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma moderadamente diferenciado. C. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma bem diferenciado. Letras minúsculas comparam os marcadores segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$69

- FIGURA 5. Análise quantitativa através do escore conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador S6K1. Fonte: arquivo pessoal (2024).....70
- FIGURA 6. Análise quantitativa através do escore conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador p-4E-BP1. Análise do escore dois normal e três normal e ceratose não apresentou amostra para análise. Fonte: arquivo pessoal (2024).....71

ABREVIATÖES

CCEs - Carcinomas de células escamosas

mTOR – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

P-4E-BP1 - Proteína 1 de ligação a 4E fosforilada

S6K1 – Quinase ribossomal S6

SRD – Sem raça definida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
1.1. Etiologia e Epidemiologia.....	03
1.1.2 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.....	05
1.2. Apresentação clínica	07
1.3. Diagnóstico.....	09
1.3.1. Citopatologia.....	10
1.3.2. Histopatologia.....	10
1.3.3. Imuno-histoquímica.....	13
2.1. OBJETIVO.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
 Capítulo 1. ESTUDO RETROSPECTIVO DE 304 CASOS DE CERATOSE ACTÍNICA E CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES E GATOS: 2008 – 2024.....	 20
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODO	24
Critérios de seleção.....	24
Design do estudo.....	24
Análise estatística	24
RESULTADOS	25
DISCUSSÃO.....	33
CONCLUSÃO.....	36
AGRADECIMENTO.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
 Capítulo 2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE FELINOS.....	 39
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODO.....	43
Design do estudo.....	43
Critérios de inclusão e exclusão.....	43
Avaliação histológica.....	43
Avaliação imuno-histoquímica.....	44
Análise estatística.....	45
RESULTADOS.....	45
Dados clínicos.....	45

DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	54
AGRADECIMENTO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
 Capítulo 3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS SELECIONADAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR NA ÁREA DE TRANSIÇÃO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES.....	58
RESUMO.....	59
ABSTRACT.....	61
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODO.....	63
Design do estudo.....	63
Critérios de inclusão e exclusão.....	63
Avaliação histológica.....	64
Avaliação imuno-histoquímica.....	64
Análise estatística.....	65
RESULTADOS.....	66
Dados clínicos.....	66
DISCUSSÃO.....	72
CONCLUSÃO.....	74
AGRADECIMENTO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
DISCUSSO GERAL.....	78
CONCLUSÃO GERAL.....	80

OLIVEIRA, A.L. **Expressão de proteínas da via de sinalização do mTOR em ceratose actínica e carcinoma espinocelular cutâneo em cães e gatos.** Botucatu, 2024. 97p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCEs) é uma neoplasia cutânea maligna, que surge a partir dos queratinócitos cutâneos. Em cães e gatos essa neoplasia apresenta alto poder de invasão tecidual. Nessas espécies os animais apresentam diversos aspectos variando desde o desenvolvimento de lesões em regiões glabras ou com pigmentação leve. A presente tese é dividida em três capítulos, que abordam diferentes aspectos do carcinoma de células escamosas em cães e gatos. O primeiro capítulo faz uma avaliação epidemiológica retrospectiva dos CCEs em cães e gatos. O segundo capítulo é focado na investigação de S6K1 e p-4E-BP1 em CCEs felinos e o terceiro capítulo investiga as mesmas proteínas em CCEs caninos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar casos de ceratose actínica e CCEs. A caracterização na mesma amostra através da utilização de marcadores da via PI3K/Akt/mTOR na transição morfológica e molecular do epitélio normal para ceratose e carcinoma. O perfil dos pacientes levantados do estudo retrospectivo de ambas as espécies apresentam características de pelagem clara e idosos o que impacta na predisposição dos pacientes. A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é um regulador chave das funções celulares, a demonstração que pacientes felinos e caninos apresentam ativação ocasionando em impacto em estudos para novas opções terapêuticas para os felinos e os caninos.

Palavras chave: imuno-histoquímica, CCEs, S6K1 e p-4E-BP1

OLIVEIRA, A.L. **Expression of mTOR signaling pathway proteins in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in dogs and cats.** Botucatu, 2024. 97p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant skin neoplasm that arises from cutaneous keratinocytes. In dogs and cats, this neoplasm has a high tissue invasion. In these species, the animals present several aspects ranging from the development of lesions in glabrous or lightly pigmented regions. This thesis is divided into three chapters, which address different aspects of squamous cell carcinoma in dogs and cats. The first chapter presents a retrospective epidemiological evaluation of SCC in dogs and cats. The second chapter focuses on the investigation of S6K1 and p-4E-BP1 in feline SCC and the third chapter investigates the same proteins in canine SCC. Thus, the present study aimed to evaluate cases of actinic keratosis and SCC. The characterization in the same sample through the use of markers of the PI3K/Akt/mTOR pathway in the morphological and molecular transition of normal epithelium to keratosis and carcinoma. The profile of patients raised from the retrospective study of both species presents characteristics of light fur and old age, which impacts the predisposition of patients. The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway is a key regulator of cellular functions, the demonstration that feline and canine patients present activation causing an impact on studies for new therapeutic options for felines and canines.

.Keywords: immunohistochemistry, SCC, S6K1 and p-4E-BP1

INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida dos cães e gatos nos últimos anos deve-se à melhoria da nutrição animal, novas terapias para tratamento de doenças e a conscientização dos tutores. O aumento da sobrevivência dos animais permitiu o surgimento de doenças, sobretudo as neoplasias. Em animais de companhia as neoplasias cutâneas são particularmente observadas com maior frequência, com destaque para carcinoma de células escamosas (CCE), mastocitoma e hemangiosarcoma (ROSOLEM et al., 2012).

O CCE é um tumor maligno epidérmico (SOBRINHO et al., 2022) e apresenta etiologia multifatorial, influenciada por predisposição genética, exposição a fatores físicos e químicos, exposição à luz ultravioleta, infecção por papilomavírus, mutações de genes e alterações na expressão de proteínas (ALVES et al., 2022). Os CCEs apresentam crescimento lento e comportamento localmente invasivo, com propensão a recidiva, predispondo a metástases em linfonodos locais e tardiamente em pulmões e ossos (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT 2017; SOBRINHO et al., 2022).

Clinicamente, pode se apresentar com lesões únicas ou múltiplas de tamanhos variáveis. A ceratose actínica é o estágio inicial da alteração celular dos queratinócitos em lesão pré-neoplásica do carcinoma espinocelular por meio da caracterização dos estágios patológicos (MEUTEN et al., 2017; ALVES et al., 2022).

O diagnóstico definitivo e rápido implica diretamente no sucesso do tratamento. Para isso é indispensável distinguir os estágios da doença para indicar o tratamento mais adequado ao paciente (PRADO et al., 2017). Os principais métodos de diagnóstico do CCEs incluem a citologia, a histopatologia e imuno-histoquímica. Esta se trata de uma técnica que consiste na detecção de proteínas em amostras fixadas em formalina e embebidas por parafinas (SANZ RESSEL et al., 2023).

O desenvolvimento dos CCEs está relacionado com a desregulação das vias de sinalização celular, a exemplo da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), o qual é responsável pelo crescimento celular e além da via PI3K/Akt/mTOR que frequentemente está desregulada em diversos tipos de câncer. Testar a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR constitui importante

ferramenta para definir um potencial alvo no tratamento (SANZ RESSEL et al., 2019).

Na literatura ao analisar e estudar o CCEs em cães e gatos pode ser constatada uma escassez de trabalhos científicos relacionados ao estudo do carcinoma cutâneo com os marcadores da via PI3K/Akt/mTOR (SANZ RESSEL et al., 2021; MAGALHÃES et al., 2024).

Neste cenário, o presente estudo avaliou a transição morfológica do epitélio no desenvolvimento do CCEs bem como a expressão de marcadores da S6K1, p-4E-BP1 da via mTOR e buscou elucidar essa atividade apresenta uma relação direta com os mecanismos desregulados envolvidos no CCEs em cães e gatos.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Etiologia e Epidemiologia

A pele é um dos órgãos mais complexos dos animais apresentando diferentes funções e melhor capacidade adaptativas as diferentes habitats. A estrutura da pele de cada animal é fortemente influenciada pelo seu ambiente e alimentação, com características próprias para cada espécie, diferente do que ocorre com a estrutura dos órgãos internos (LARSSON; LUCAS, 2016).

As principais funções da pele se apresenta de forma variada sendo divididas em dois grandes grupos: dentre as funções da pele comum a todos os mamíferos se dá a proteção agentes físicos e químicos, o qual evita a dessecação ou penetração de água, barreira contra entrada de microorganismos, além da proteção contra radiação ultravioleta, produz vitamina D, regula a temperatura corporal, quanto as ações da pele nos animais domésticos são determinação do comportamento sexual e reprodutor, sinaliza reações e ataque e defesa, reconhecimento individual interespecífico, exploração ambiental, marcação de território, proteção contra sol, respiração e manutenção da temperatura corporal (LARSSON; LUCAS, 2016).

A anatomia da pele é dividida em camadas ou estratos especializados que constituem a pele são: epiderme, derme e tecido subcutâneo. Esse último conecta a epiderme e a derme as fáscias musculaturas subjacentes (HARGIS, 1998; LARSSON; LUCAS, 2016).

A epiderme é camada mais externa da pele, constituída por um epitélio estratificado, pavimentoso e ceratinizado, e subdividida em estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo. A espessura, o tipo de camada córnea e a presença ou ausência do estrato lúcido são influenciados pela densidade da pelagem. A epiderme é constituída por quatro tipos celulares: ceratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A quantidade de cada uma dessas células é variável, mas aproximadamente 85% delas são ceratinócitos, 5% - 8% são melanócitos e 5% são células de Langerhans. Os ceratinócitos migram constantemente para formar os diferentes estratos epidérmicos de modo que o estrato basal é o berço das células da epiderme e a ceratina é o produto da diferenciação dos ceratinócitos basais. A

epiderme apresenta uma estrutura dinâmica constantemente renovada pela descamação do estrato córneo. Alguns autores consideram que a diferenciação final da epiderme em estrato córneo é uma forma especializada de apoptose (WEBB; CALHOUN 1954; SCOTT et al., 2001, LARSSON; LUCAS, 2016).

A derme é formada por tecido conjuntivo, na forma de fibras entrelaçadas, pelos elementos celulares dérmicos e pelos apêndices epidérmicos, folículos pilosos e glândulas anexas. E na derme estão localizados vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos e músculo eretor (BRAGULLA et al., 2004, HARGIS; GINN, 2007).

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor maligno, originado de células epidérmicas com diferenciação dos ceratinócitos presentes na camada espinhosa (estrato espinhoso) (Figura 1) (SOBRINHO et al., 2022). Essa neoplasia também pode ser denominada como carcinoma epidermoide, carcinoma espino celular ou carcinoma plano celular (MANESH et al., 2014; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

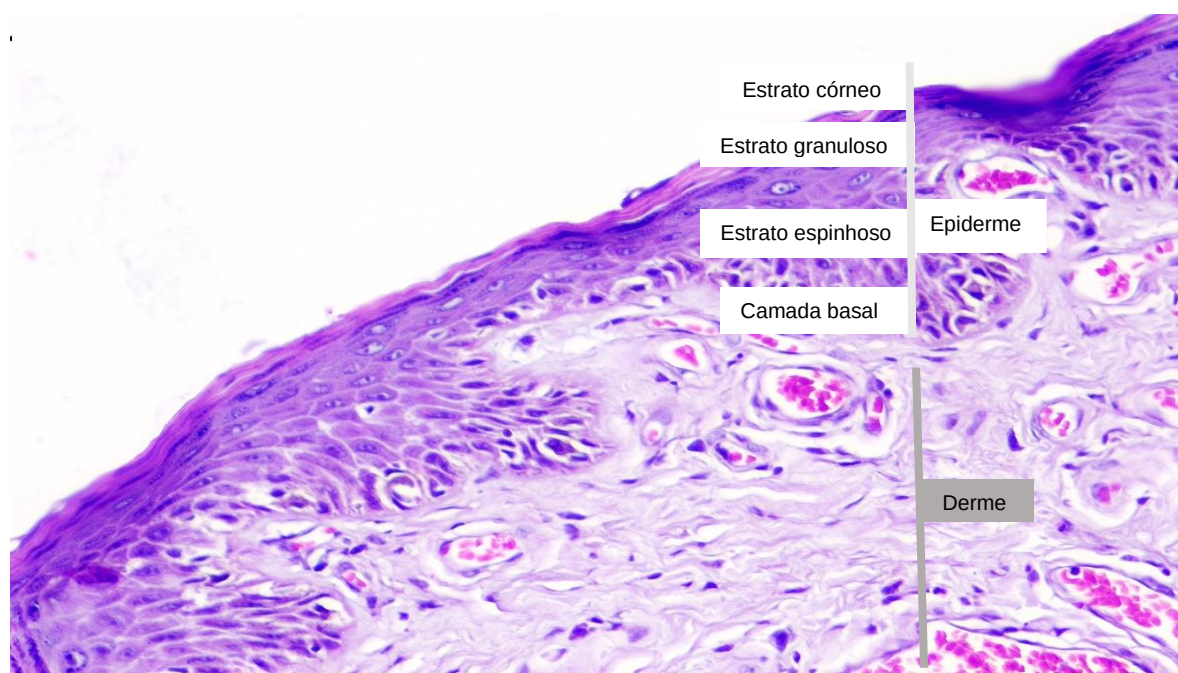


FIGURA 1. Histopatologia da pele normal apresentando as camadas que compõe a epiderme e derme (40x). Fonte: arquivo pessoal (2024).

A etiologia do CCE envolve fatores como a predisposição genética, exposição a agentes físicos e químicos, exposição à luz ultravioleta, infecção por papilomavírus e alterações na expressão de proteínas como genes supressores

tumorais p53 e p16 (ALVES et al., 2022; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016; MUNDAY et al., 2011a, 2011b; RENZI et al., 2019; RODASKI; WERNER, 2009). Nos animais CCEs e mais observado em: gatos, cães, equinos, bovinos e com menor ocorrência caprinos, ovinos e suínos (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

A ocorrência e incidência dos CCEs em animais domésticos podem estar associado à localização geográfica, ou anatômica das lesões e as mudanças climáticas, uma vez que a exposição prolongada aos raios solares é fator determinante no desenvolvimento da doença (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017, GARCIA et al., 2018).

Regiões localizadas próximas a linha do Equador recebem maior incidência de raios solares, o que pode estar associado ao aumento de casos de inflamação crônica na pele, neoplasias cutâneas, CCEs e outros tipos de doenças cutâneas (LEONE et al., 2019; TORRES et al., 2023).

As mutações ocorrem devido à alta taxa de renovação celular da pele pela exposição direta a fatores oncogênicos a exemplo da luz solar, que induz a sensibilização da pele, também conhecido como ceratose actínica (ALVES et al., 2022). A radiação ultravioleta pode estar associada ao aparecimento de eritema, pigmentação na pelagem. Quanto maior a intensidade e o comprimento de onda maior o poder de penetração na pelagem do animal. Além disso, fatores como a altitude, latitude, estação do ano, condições atmosféricas também contribuem com o surgimento de doenças. Cães com predisposição genética a dermatite actínica ou ceratose actínica está relacionado a maior exposição a radiação solar (NITTA, 2019).

1.1.2 Via de sinalização PI3K/Akt/mTOR

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é um regulador chave das funções celulares, sendo estudado nos últimos anos como alvo na terapia do câncer em humanos, e cães e gatos (KENT et al., 2009; CHEN et al., 2012; SANZ RESSEL et al., 2019; MEUTEN et al., 2024).

A ativação da via PI3K/Akt/mTOR pode estar relacionada ao prognóstico devido a ativação das proteínas envolvidas, entre os constituintes da via mTOR o alvo da rapamicina em mamíferos é importante no processo do crescimento

tumoral e no seu desenvolvimento (Figura 2) (CHANG et al., 2013; CARGNELLO et al., 2015).

Sinalização da via mTOR

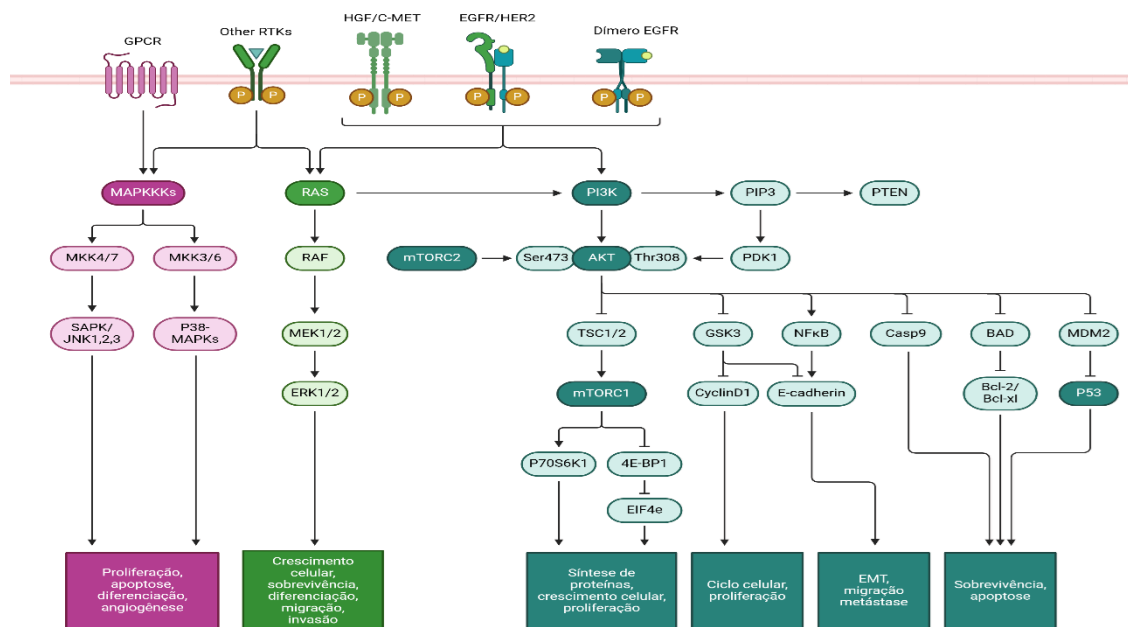


FIGURA 2. Descrição da via mTOR/4E-BP1/eIF4E. Fonte: criado com BioRender.com. (2024).

A via mTOR/4E-BP1/eIF4E apresenta-se alterada no hemangiossarcoma e no carcinoma mamário em cães, já na epiderme canina normal apresenta baixa expressão para duas proteínas pAktSer473 e pS6Ser235/236 com Ki-67 e, durante o processo de carcinogênese epidérmica essa molécula dessa via de sinalização apresenta-se desregulada e o estudo dessa via se torna de importância terapêutica para tumores (DELGADO et al., 2015; SANS RESSEL et al., 2019).

Evidências emergentes sugerem que a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase/Akt/alvo mamífero da rapamicina (PI3K/Akt/mTOR) podem representar um potencial alvo para intervenção farmacológica em CCE humano e canino (SANZ RESSEL et al., 2021). A superexpressão de algumas moléculas sinalizadoras pode facilitar a progressão dos CCEs canino pela desregulação das principais funções celulares (SANZ RESSEL et al., 2019).

Esses relatos podem facilitar a progressão de papilomas cutâneos para carcinomas de células escamosas envolvendo a via de sinalização

PI3K/Akt/mTOR, um regulador chave das funções celulares (SANZ RESSEL et al., 2019),

A expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico fosforilado (pEGFR) e dos homólogos de fosfatase e tensina (PTEN) em papilomas cutâneos caninos e carcinomas de células escamosas foram descritos como desregulados na maioria das amostras, sendo uma superexpressão de pEGFR e diminuição da expressão de PTEN (SANZ RESSEL et al., 2021).

A proteína ribossômica S6-quinase-1 (S6K1) é um regulador adjuvante da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR, um regulador central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese. Em humanos a proteína ribossômica S6-quinase-1 S6K1 foi investigada como marcador prognóstico e preditivo da terapia direcionada ao mTOR. No câncer de mama é um regulador central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese (KIM et al., 2017).

A fosforilação de 4EBP1 por mTORC1 promove a dissociação de 4EBP1 de EIF4E, permitindo que EIF4E induza tradução de proteínas. Consequentemente, 4EBP1 fosforilado (p-4E-BP1) é aceito como um marcador de sinalização da via mTOR (KARLSSON et al., 2013).

A via mTOR apesar do seu papel de proliferação, sobrevivência, consumo energético, atividade metabólica e síntese proteica, pode ser utilizada como prognóstico em possíveis ensaios clínicos, para testar a eficácia no tratamento de diferentes formas de câncer, como por exemplo o cutâneo, hemangiossarcoma e no carcinoma mamário (CHEN et al., 2012).

1.2. Apresentação clínica

Apresentação clínica do CCEs em cães e gatos tem uma ampla variação quanto à localização, ao desenvolvimento e à progressão tumoral (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Animais que apresentam uma pelagem clara (pouca pigmentação) e curta são mais predispostos ao desenvolvimento do tumor, e seus fatores também contribuem para a localização da lesão (GROSS et al., 2009). Os CCEs podem ser induzidos pela radiação solar, com o desenvolvimento previsto de alterações pré-neoplásicas (ceratose actínica). As manifestações incluem: edema, eritema e descamação da epiderme, seguidas por formação de crostas. Em casos

crônicos observam-se espessamento da epiderme com subsequente ulceração e invasão da derme, a qual adquire um aspecto firme (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Em cães o CCEs pode se desenvolver em cabeça, abdômen (Figura 3), membros torácicos e pélvicos, períneo e dígitos (ungueal) (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). Ainda se apresenta como uma massa única, exofítica e/ou verrucosa e por vezes ulcerada (GROSS et al., 2009).



FIGURA 3. A. Canino apresentando eritema em região abdominal com discreta escarificação e disqueratose. B. Canino apresentando lesão ulcerada eritematosa e gomosa. Fonte: arquivo pessoal (2024).

As raças de cães mais afetadas são: pit bull terrier, dalmata, dogue alemão (arlequim) e beagle (GROSS et al., 2009), schnauzer, basset hound e collie. Outras raças como boxer, poodle, dachshund, scottish terrier e norwegian elkhound também são citadas (RODASKI; WERNER, 2009). Em outro estudo, os cães sem raça definida foram os mais acometidos pelo CCEs (36%), seguido pelo american pit-bull (DEBOYA et al., 2017).

Nos felinos, as lesões normalmente estão localizadas em pinas e plano nasal (Figura 4) e, em menor frequência, nas pálpebras e lábios

(GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; GROSS et al., 2009; RODASKI; WERNER, 2009). As principais raças de felinos acometidos são: persa, himalaio e siamês (GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

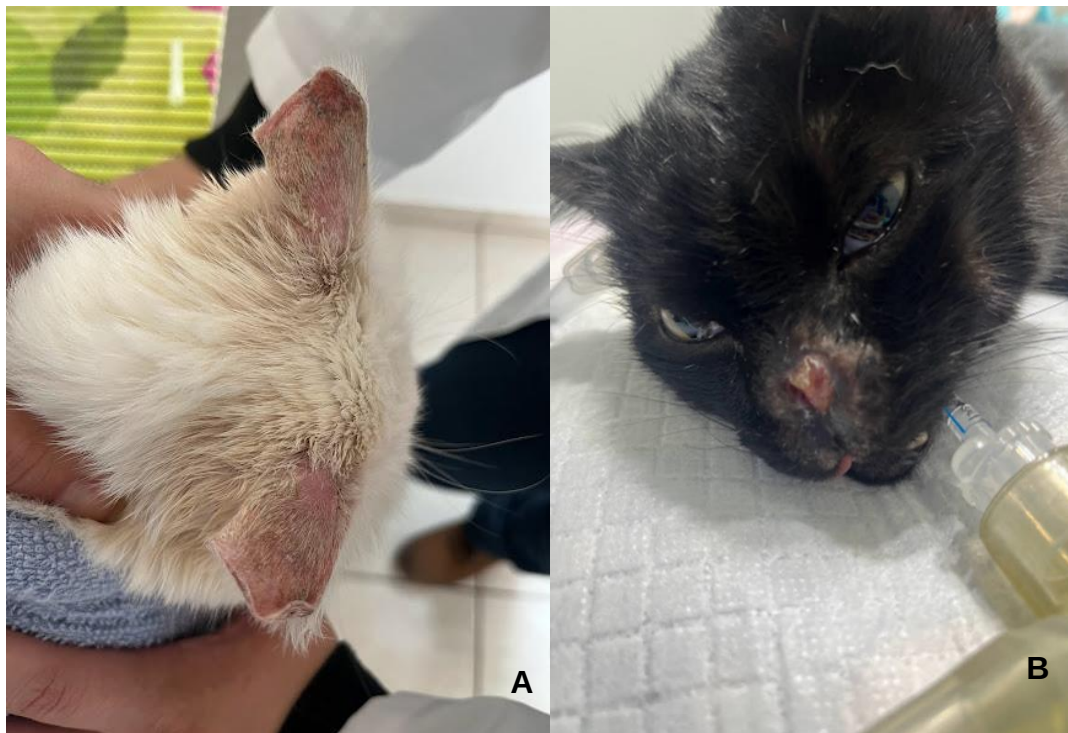


FIGURA 4. A. Felino apresentando ceratose actínica com envelopamento de pinas com eritema e disqueratose. B. Felino apresentando lesão ulcerada em plano nasal. Fonte: arquivo pessoal (2024).

Os felinos apresentam CCEs de uma forma mais invasiva e destrutiva, principalmente quando acomete pinas e o plano nasal, diferentemente dos cães (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; GROSS et al., 2009).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico do CCEs deve ser realizado precocemente para o início do protocolo de tratamento e maiores chances de sucesso para o animal (SANZ RESSEL et al., 2023) Através do diagnóstico é possível diferenciar os estágios da doença e definir as melhores opções de tratamentos para cada paciente (PRADO et al., 2017). A ceratose actínica é considerada uma lesões pré-neoplásicas e pode aparecer de forma sutil quando comparada com os casos CCEs de alto grau de evolução que apresenta mais fácil o diagnóstico (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

O diagnóstico pode ser realizado por: citologia, histopatologia e imuno-histoquímica (SANZ RESSEL et al., 2023). A avaliação da pesquisa de metástase é realizada por meio de radiografias torácica (TORRES et al., 2023).

1.3.1. Citopatologia

O exame citopatológico proporciona diagnóstico rápido CCEs (Figura 5), considerado uma técnica de fácil execução, baixo custo e não invasiva. No entanto, não permite classificar e definir o prognóstico tumoral (TORRES et al., 2023).

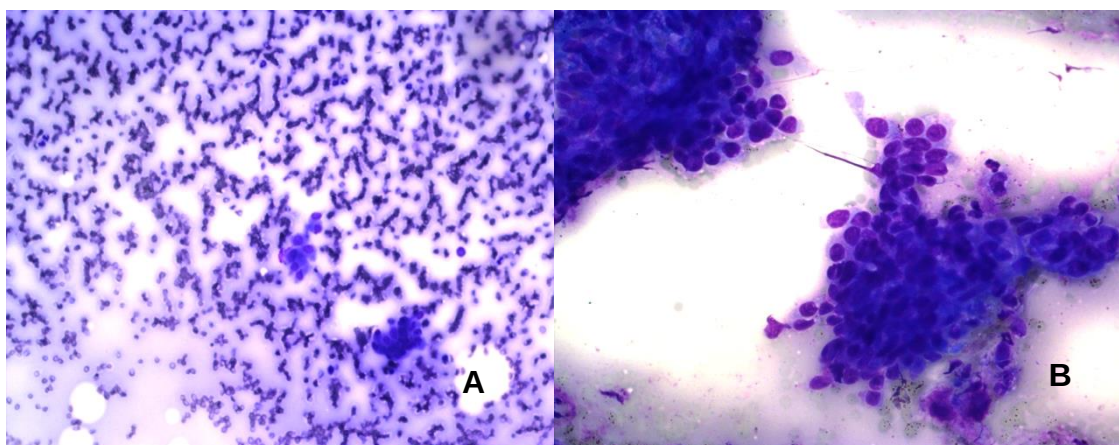


FIGURA 5. A. Citologia de paciente felino apresentando CCEs (20x). B. Citologia de paciente canino apresentando CCEs (40x). Fonte: arquivo pessoal (2024).

1.3.2. Histopatologia

O exame definitivo do CCEs pode ser realizado através do exame histopatológico (PRADO et al., 2017), por meio da biópsia excisional ou incisional (Figura 6). A maioria das lesões são superficiais ou estão inflamadas, tornando o diagnóstico limitado por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (THOMSON 2007; MURPHY, 2013). A confirmação tumoral é indispensável para o prognóstico e terapia para o CCEs (SOBRINHO et al., 2022).



FIGURA 6. A. Felino apresentando pontos de sutura após realização de biópsia e coleta de três fragmentos com punch. B. Conchectomia parcial em felino C. Biópsia excisional de nódulos em região abdominal de canino. D. Biópsia da região facial de canino com coleta de dois fragmentos. Fonte: arquivo pessoal (2024).

As características histológicas do CCEs, consiste na presença de proliferação de ceratinócitos neoplásicos, em formato de cordões ou ninhos e invasão da derme com formação das pérolas de queratinas (GROSS et al., 2009).

Os CCEs apresentam características histológicas distintas quanto a diferenciação celular, consequentemente podem ser classificados em três subtipos sendo: carcinoma de células escamosas bem diferenciado, carcinoma de células escamosa moderadamente diferenciado e carcinoma de células escamosas pouco diferenciado (Figura 7) (MANESH et al., 2014; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; ORTLOFF et al., 2020).

Outras apresentações menos descritas do carcinoma pode ser relatada como o carcinoma acantolítico, carcinoma de células claras, carcinoma de células fusiformes e verrucoso, carcinoma de células escamosas com metaplasia mucinosa (GROSS et al., 2009; SANTOS et al., 2021).

Para avaliação da graduação do CCEs alguns aspectos são avaliados como: localização e tamanho do tumor, cariomegalia, anisocariose, anisocitose, pleomorfismo nuclear, irregularidades da cromatina, nucléolos atípicos e índice mitótico (MAIOLINO et al., 2002; MARQUES et al., 2020).

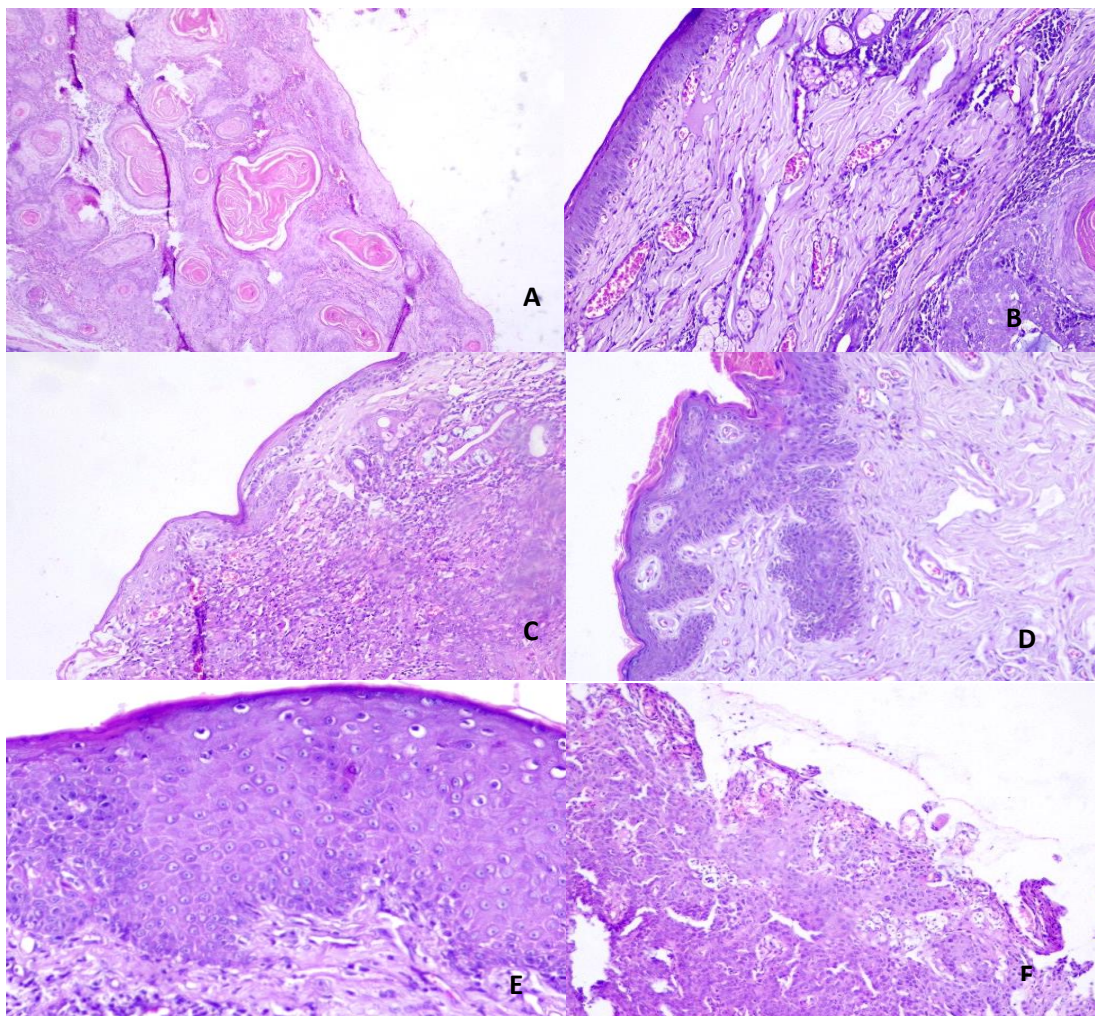


FIGURA 7. A. Histopatológico do paciente felino mostrando presença de pérolas de ceratina (10x). B. Histopatológico de paciente canino com presença de ceratinócitos com pérolas de ceratina (10x). C. Histopatológico do paciente felino com carcinoma moderadamente diferenciado (10x). D. Histopatológico de paciente canino com carcinoma moderado diferenciado (10x). E. Histopatológico de paciente felino com presença de carcinoma pouco diferenciado (40x). F. Histopatológico de paciente canino com carcinoma pouco diferenciado. Fonte: arquivo pessoal (2024).

1.3.3. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica na Medicina Veterinária vem sendo empregada para a caracterização de algumas neoplasias focada no diagnóstico, prognóstico, decisões terapêuticas, e para adaptar o tratamento a um paciente e investigações sobre a patogênese da doença (RAMOS-VARA; MILLER, 2014). A técnica combina reações imunológicas e químicas, permitindo o

reconhecimento de antígenos na detecção do estado fosforilado das proteínas de sinalização em amostras fixadas e embebidas pela parafina, com utilização de anticorpos específicos (RAMOS-VARA; BORST, 2017; RAMOS-VARA; MILLER, 2014; SANS RESSEL et al., 2023).

A utilização da técnica pode ser dividida em três etapas sendo: primeira (pré-analítica), segunda (analítica) e terceira (pós-analítica). A primeira etapa (pré-analítica) começa com a obtenção da amostra, seguida pela coleta do tecido fixação, aparagem e incorporação, e finalização com tecido seccionado em um micrótomo (RAMOS-VARA; MILLER, 2014).

A segunda etapa começa com a desparafinação de cortes de tecido; inclui etapas de pré-incubação (recuperação de antígeno, bloqueio de atividades não específicas), incubação com o anticorpo primário e marcação do antígeno-anticorpo reação; e termina com a contra coloração da lâmina e a aplicação de lamínula. Neste momento ocorre a primeira reação imunológica entre o antígeno e a amostra, com o anticorpo primário, a segunda reação vai ocorrer entre o anticorpo primário e o anticorpo secundário. A reação química acontece quando as peroxidases (presentes na estrutura do anticorpo secundário) reagem com o cromógeno (3,3' diaminobenzidina). Por meio dessa reação é possível observar a imunomarcagem (ligação) entre o antígeno e o anticorpo na avaliação microscópica (Figura 8) (DABBS, 2006, RAMOS-VARA; MILLER, 2014). Na terceira etapa inclui a interpretação dos resultados e geração de um relatório da imuno-histoquímica, bem como avaliação dos controles (RAMOS-VARA; MILLER, 2014).

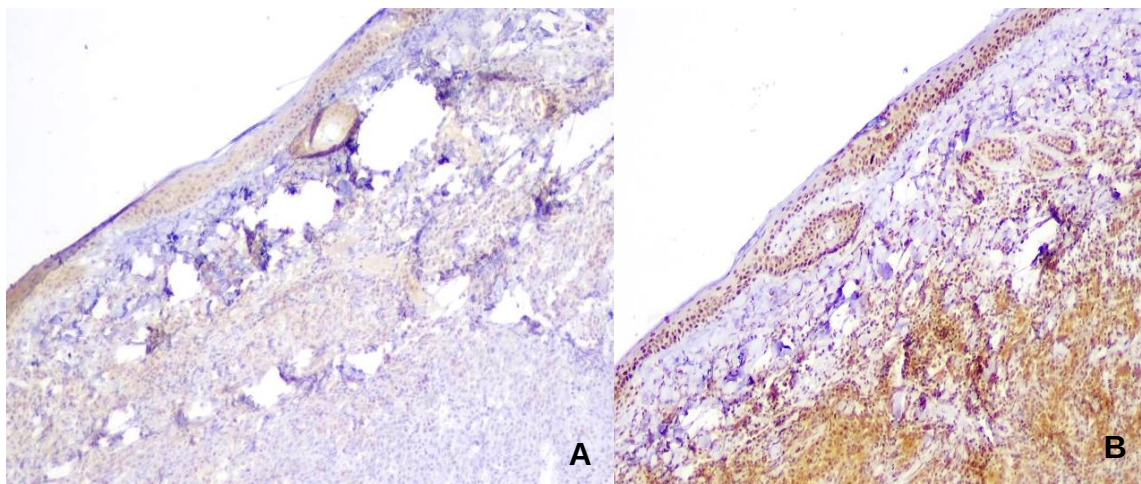


FIGURA 8. A. Imunoreatividade de S6K1 em amostra de paciente felino apresentando carcinoma espinocelular (10x). B. Imunoreatividade de p-4E-BP1 em amostra de paciente felino apresentando carcinoma espinocelular (10x). Fonte: arquivo pessoal (2024).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo avaliar retrospectivamente casos CCEs e caracterizar a transição morfológica e molecular do epitélio normal para ceratose e carcinoma em cães e gatos.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar uma avaliação dos dados epidemiológicos de cães e gatos acometidos por ceratose actínica e carcinoma de células escamosas.
- Padronizar a imuno-histoquímica por meio da expressão de algumas proteínas chaves em amostras de tecido parafinado dos casos de ceratose actínica, carcinoma determinando o fator prognóstico do caso.
- Avaliar o potencial prognóstico dos marcadores S6K1, p-4E-BP1 em relação ao CCEs e ceratose actínica.
- Avaliar a expressão das formas fosforiladas de algumas proteínas da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR.
- Avaliar a sobrevida de cães e gatos com ceratose actínica e CCEs de acordo com o tratamento empregado.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.S.; CAVALCA, A.M.B.; ALVES, C.E.F. A Critical Review of the risk factors associated with Canine Squamous Cell Carcinoma development. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2022. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v15i1p1-10.

BRAGULLA, H.; BUDRAS, K.D.; MÜLLING C.; REESE, S.; KÖNIG, H.E. Tegumento comum, p.325-380. In: König H.E. & Liebick H.G. (Ed.), **Anatomia dos Animais Domésticos**: texto e atlas colorido. Vol.2. Artmed, Porto Alegre. p.399, 2004.

CARGNELLO, M.; TCHERKEZIAN, J.; ROUX, P.P. The expanding role of mTOR in 312 cancer cell growth and proliferation. **Mutagenesis**, v. 30(2), n. 176 p. 169-313, 2015. DOI:10.1093/mutage/geu045

CHANG, L.; GRAHAM, P.H.; HAO, J.L.; NI, J.; BUCCI, J.; COZZI, P.J.; KEARSLEY, J.H.; LI, Y. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell 316 phenotypes is associated with activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in 317 prostate cancer radioresistance. **Cell Death Dis**, v. Oct 24; n. 4(10): p. 875, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.407.

CHEN, Y., TAN, K.A., PANG, L.Y., ARGYLE, D. The class I PI3K/Akt pathway is 320 critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity therapeutic 321 intervention. **BMC Vet Res**, v. 8,73, 2012 DOI:10.1186/1746-6148-8-73

DABBS D.J. **Diagnostic Immunohistochemistry**. 2. ed. Elsevier, 2006. 828p

DELGADO, L., GÄTNER, F., DIAS-PEREIRA, P. Activation of mammalian target of 336 rapamycin in canine mammary carcinomas: an immunohistochemical study. **J Comp Path**, v. 152(2-3), p. 138-144, 2015. DOI:10.1016/j.jcpa.2014.12.004

GARCIA JA, QUINTEROS C, ROMERO A, DUTRA F. Ocurrence of squamous cell carcinoma in Milschschaf sheep in Uruguay. *Ciência Rural*, 48, 1-7,2018.

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFR, F.S. 1992. **Skin tumors of the dog and cat**. Oxford: Pergamon, p.316.

GOLDSCHMIDT, M.H.; GOLDSCHMIDT, K.H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. IN: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. fifth edition. ames, Iowa : john wiley & sons inc., 2017, p. 88 – 141.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Doenças de pele do cão e do gato: 347 diagnóstico clínico e histopatológico**, 2th Edit, Ed, Roca, São Paulo, p. 837-842, 2009.

HARGIS, A.M. Sistema tegumentar. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed. São Paulo: Artmed, 1998. p.486-540

HARGIS A.M. & GINN P.E. The integument. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Ed.), **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis, p.1107-1261, 2007.

MAULDIN, E.A.; PETERS-KENNEDY, J. Integument System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's 349 Pathology of Domestic Animals, 6th Edit, Maxie MG, Ed, Elsevier, St. Louis, Missouri, 350 p. 712-714, 2016.

KARLSSON, E.; TENORIO, G.P.; AMIN, R.; BOSTNER J.; SKOOG, L.; FORNANDER, T.; SGROI, D.C.; NORDENSSKJOLD B.; HALLBECK, A.L.; STAL, O. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomized Stockholm tamoxifen trials. **Breast cancer research**, v.15, n.5, 2013. DOI: 10.1186/bcr3557.

KIM, H.A.; KIM, J.H.; CHOI, H.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J.; HAN, K.H.; SEONG, M.K.; SEOL, H.S.; NOH, W.C. Core needle biopsy specimens are more appropriate than surgical specimens for evaluating the expression of phosphoproteins as biological markers in invasive breast cancer. **Anticancer Research**, v.37, n.3, p.1409-1412, 2017. DOI: 10.21873/anticancer.11463.

KENT, M.S.; COLLINS, C.J.; YE, F. Activation of the AKT and mammalian target of 376 rapamycin pathways and the inhibitory effects of rapamycin on those pathways in 377 canine malignant melanoma cell lines. **Am J Vet Res**, v. 70(2), p. 263- 378, 2009. DOI:10.2460/ajvr.70.2.263

LARSSON, C.E.; LUCAS, R. Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária. **São Caetano do Sul**, SP: interbook 2016.

LEONE, P.E.; GUEVARA P.; ZAMBRANO A.K.; PÉREZ, A.; ARMENDÁRIZ, I.; GARCÍA, J.M.; GUERRERO, S.; LÓPEZ, A.; YUMICEBA, V.; PAZ, C. Genes involved in damage response caused by UV radiation in Ecuadorian population of different altitude regions. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**. v.7, n. 1, p. 140-141, 2019. DOI: 10.1016/j.fsigss.2019.09.054

MANESH, J.Y.Y.; SHAFIE, R.; BAHRAMI, A.M.; POURZAER, M.; POURZAER, M.; PEDRAM, B.; JAVANBAKHT, J.; MOKARIZADEH, A.; KHADIVAR, F. Cyto-histopathological and outcome features of the prepuce squamous cell carcinoma of a mixed breed dog. **Diagnostic Pathology**, v. 9, p. 1-7, 2014. DOI: 10.1186/1746-1596-9-110

MARQUES, G.R.; ROCHA, L.F.; VARGAS, T.H.M.; PULZ, L.H.; HUETE, G.C.; CADROBBI, K.G.; PIRES, C.G.; SANCHES, D.S.; MOTA, E.F.F.; STREFEZZI, R.F. Relationship of galectin-3 expression in canine cutaneous squamous cell

carcinomas with histopathological grading and proliferation indices. **Journal of Comparative Pathology**, v. 178, p. 16–21, 2020. DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.06.004

MAGALHÃES, P.L.; NASCENTE, E.P.; FALEIRO, ALMEIDA, A.M.S.; FONSECA-ALVES, C.E.; MOURA, V.M.B.D. Immunostaining and gene expression of epidermal growth factor receptors (HER1/HER2) in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **Research in Veterinary Science**, 177 105363, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105363>

MAULDIN, E.A.; PETERS-KENNEDY, J. Integument System. In: Jubb, Kennedy, and Palmer's **Pathology of Domestic Animals**, 6th Edit, Maxie MG, Ed, Elsevier, St. Louis, Missouri, p. 712-714, 2016.

MEUTEN, D.J. Tumores em animais domésticos. 5 ed. Wiley-Blackwell, Hoboken, **New Jersey**, p. 1008, 2017.

MEUTEN, T. K.; DEAN, G.A.; THAMM, D.H. Review: The PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathway in canine câncer. **Vet Pathol**, v. 61(3), p. 339-356, 2024. DOI: 10.1177/03009858231207021

MUNDAY, J.S.; FRENCH, A.F.; PETERS-KENNEDY, J.; ORBELL, G.M.B.; GWYNNE, K. Increased p16CDKN2A protein within feline cutaneous viral plaques, bowenoid in situ carcinomas, and a subset of invasive squamous cell carcinomas. **Veterinary Pathology**, v.48, n.2, p. 460-465, 2011a. DOI: 10.1177/03009858103748.

MUNDAY, J.S.; GIBSON, I.; FRENCH, A.F. Papillomaviral DNA and increased p16CDKN2A protein are frequently present within feline cutaneous squamous cell carcinomas in ultraviolet-protected skin. **Veterinary Pathology**, v.22, p. 360-366, 2011b. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.00958.x

MURPHY, S. Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. **Journal of feline medicine and surgery**, v.15, n.5, p. 401-407, 2013. DOI: 10.1177/1098612X13483238.

ORTLOFF, A.; BUSTAMANTE, F. A.; MOLINA, L.; OJEDA, J.; FIGUEROA, C. D.; EHRENFELD, P. Kallikrein-related peptidase 5 (klk5) expression and distribution in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 174, p. 113– 119, 2020. DOI: 10.1016/j.jcpa.2019.11.009

PRADO, L.O.C.; ROSETTO, V.J.V.; CARVALHO, L.M.C.R.; FERREIRA, A.P.; MATSUBARA, L.M.; RODRIGUES, J.C.Z.; BRANDÃO, C.V.S. Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.69, n.4, p. 877-882, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9060>.

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown,

and blue technique. **Veterinary Pathology**, v.51, n.1, p.42-87, 2014. DOI: 10.1177/0300985813505879

RENZI, A.; BONIS, P.; MORANDI, L.; LENZI, J.; TINTO, D. Prevalence of p53 dysregulations in feline oral squamous cell carcinoma and non-neoplastic oral mucosa. **Plos One**, 14, 4507, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0215621

RODASKI, S.; WERNER, J. Neoplasias de Pele. In: Daleck, C.R.; De Nardi, A.B.; Rodaski, S. **Oncologia em cães e gatos**: ed.1, Roca: São Paulo, p.258-261, 2009.

ROSOLEM, M.C.; MOROZ, L.R.; RODIGHERI, S.M. Carcinoma de células escamosas em cães e gatos: Revisão de literatura. **PUBVET**, v. 6, n. 6, p. 1-17, 2012.

SANTOS, A.; AMBROSIO, M.B.; FLORES, M.M.; KOMMERS, G.D.; Cutaneous Squamous Cell Carcinoma with Mucinous Metaplasia in Dogs. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, 2021. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.112037>.

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signaling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **The Veterinary Journal**, v. 245, p. 41-48, 2019. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.12.024

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Expression of the epidermal stem cell marker p63/CK5 in cutaneous papillomas and cutaneous squamous cell carcinomas of dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 366–70, 2021. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.10.018

SANZ RESSEL, B.L.; MOLINOLO, A.A. Immunohistochemical Techniques for Phosphoproteins. **Signal Transduction Immunohistochemistry**, v. 2593, p. 259-264, 2023. DOI: 10.1007/978-1-0716-2811-9_17.

SCOTT D.W., MILLER D.H. & GRIFFIN C.E.. Muller and Kirk's. **Small Animal Dermatology**. 6th ed. Saunders, Philadelphia, p. 1528, 2001.

SOBRINHO, A.V.A.; ALVES-RIBEIRO, B.S.; MORAES, I.S.; RAMOS, D.G.S.; SATURNINO, K.C. Diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em cão – relato de caso. **I Congresso Nacional de Especialidade Veterinárias**, 2022. DOI: 10.51161/convesp/7325.

TORRES, L.E.C.; LOPEZ, A.E.G.; PRADO, R.G.S.; ARÉVALO, G.M.A.; PIRES, C.R.S. Carcinoma de células escamosas em gato – tratamento com quimioterapia metronômica, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 51, p. 1-5, 2023. DOI: 10.22456/1679-9216.126467

WEBB A.J. & CALHOUN M.L. 1954. The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. **Am. J. Vet. Res.** 15:274-280.

Capítulo 1

**ESTUDO RETROSPECTIVO DE 304 CASOS DE CERATOSE ACTÍNICA E
CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES E GATOS DA UNESP –
BOTUCATU-SP: 2008 – 2024**

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCEs) é um tumor maligno da epiderme, que apresenta uma etiologia multifatorial que inclui, desde a predisposição genética, exposição a fatores físicos e químicos, infecção por papilomavírus e alterações na expressão de algumas proteínas. A compreensão dos estudos retrospectivos faz refletir o porquê vem sendo crescente o aumento dos casos das doenças como: ceratose actínica e do CCEs em cães e gatos, refletindo na real prevalência e incidência dessa doença, impactando no prognóstico assertivo. Objetivo deste trabalho foi realizar o estudo retrospectivo dos casos de ceratose actínica e CCEs em cães e gatos o período de 2008 – 2024, sendo possível identificar 200 cães (25 machos e 175 fêmeas) e 104 gatos (34 machos e 70 fêmeas) acometidos por CCE. A idade média de cães acometidos foi de $8,01 \pm 3,55$ anos e dos gatos foi de $9,43 \pm 4,08$. Em relação a localização das lesões, nos cães as regiões mais acometidas foram abdominal (78/200) e peniana (39/200) e nos felinos o padrão de lesão demonstrou mais em região de pina (39/104) e (28/104) plano nasal. Tanto em cães (142/199) quanto gatos (38/102), o procedimento cirúrgico foi o mais realizado nodulectomia e conchectomia respectivamente. A média de sobrevida dos cães acometidos foi de $1,49 \pm 1,94$ anos, e dos gatos $1,28 \pm 1,64$ ano. Pode-se concluir que o CCEs em cães e gatos acomete mais idosos, de pele e pelos claros e que o tratamento mais realizado é a cirurgia.

Palavras chave: câncer de pele, felinos, caninos

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant tumor of the epidermis, which has a multifactorial etiology that includes genetic predisposition, exposure to physical and chemical factors, papillomavirus infection and alterations in the expression of some proteins. Understanding retrospective studies makes us reflect on why the increase in cases of diseases such as actinic keratosis and SCC in dogs and cats has been increasing, reflecting the real prevalence and incidence of this multifactorial disease, impacting the assertive prognosis. The objective of this study was to perform a retrospective study of cases of actinic keratosis and SCC in dogs and cats from 2008 to 2024. It was possible to identify 200 dogs (25 males and 175 females) and 104 cats (34 males and 70 females) affected by SCC. The mean age of affected dogs was 8.01 ± 3.55 years and of cats it was 9.43 ± 4.08 . Regarding the location of the lesions, in dogs the most affected regions were abdominal (78/200) and penile (39/200) and in felines the lesion pattern demonstrated more in the pinna region (39/104) and (28/104) nasal plane. In both dogs (142/199) and cats (38/102), the surgical procedure most performed was nodulectomy and conchectomy respectively. The mean survival of affected dogs was 1.49 ± 1.94 years, and of cats 1.28 ± 1.64 years. It can be concluded that SCC in dogs and cats affects more frequently middle-aged to elderly animals, with light skin and fur, and that the most performed treatment is surgery.

Keywords: skin cancer, felines, canines

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCEs) apresenta sua origem das células epidérmicas com diferenciação para ceratinócitos presentes na camada espinhosa ou estrato espinhoso da epiderme. Dentre as doenças a CCEs podendo ser considerada um dos tumores malignos cutâneos frequentes que acometem os cães e gatos (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; ALVES et al., 2022).

A etiologia está associada desde a predisposição genética, exposição aos fatores físicos e químicos, localização geográfica, mudanças climáticas, exposição prolongada aos raios solares (MAULDIN; PETERS-KENNEDY, 2016; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Comumente, o carcinoma de células escamosas ocorre a partir da evolução de uma lesão pré-neoplásicas denominada ceratose actínica. A ceratose actínica é o estágio inicial da alteração celular dos queratinócitos em lesões pré-neoplásicas e podem aparecer de forma sutil quando comparado com os casos CCEs de alto grau de evolução que apresentam mais fácil o diagnóstico, as lesões de ceratose actínica tem sido atribuída a exposição solar excessiva (GROSS et al., 2005; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; ALVES et al., 2022). Com o aumento dos casos das doenças como a ceratose actínica e dos CCEs em cães e gatos, torna-se cada vez mais essencial utilizar o estudo retrospectivo, para entender a real prevalência e incidência dessa doença que apresenta como base de etiologia multifatorial impactando no prognóstico assertivo (SOUZA., et al 2006; MANUEALI et al., 2020).

Apesar da importância da epidemiologia de diferentes tumores, no Brasil, poucos estudos epidemiológicos foram realizados para diferentes neoplasias, incluindo o CCE. Em um estudo epidemiológico de neoplasias cutâneas em cães, os autores avaliaram 761 tumores cutâneos e dentre eles apenas 53 carcinomas de células escamosas (SOUZA et al., 2006). Em um estudo colombiano, foram avaliados retrospectivamente dados epidemiológicos de 82 casos de bovinos CCE (CEDENO QUEVEDO et al., 2019). A apresentação mais frequente foi a ocular e periorbital, identificando que a apresentação do

CCE depende primariamente da localização da lesão. Infelizmente, a literatura brasileira é focada em relatos de casos isolados, e nenhum estudo epidemiológico prévio mais robusto foi publicado.

Desta maneira, o objetivou-se realizar um estudo retrospectivo dos casos de ceratose actínica e CCEs em cães e gatos no período de 01 de janeiro de 2008 até 31 de julho de 2024 na cidade de Botucatu – SP e entender a prevalência dessas doenças em relação: sexo, idade, raça, localização de lesão, coloração da pelagem dos pacientes, tratamento realizado e sobrevida global.

MATERIAL E MÉTODOS

Critérios de seleção

Design do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo não randomizado de cães e gatos diagnosticados com ceratose actínica e carcinoma de células escamosas (CCEs). A execução do trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética protocolo CEUA 1005. Foram analisados total de 304 casos diagnosticadas com ceratose actínica e carcinoma de células escamosa em cães e gatos, do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da Unesp – Botucatu. O período abordado foi de 01 de janeiro de 2008 até 31 de julho de 2024, sendo coletado os dados clínicos como raça, sexo, idade e coloração da pelagem, localização das lesões, tempo de sobrevida l, procedimento realizado em relação ao tratamento.

Análise estatística

Pressupostos de distribuição normal foram avaliados com o test de Shapiro -Wilk. Transformação em log foi utilizada quando necessário. A análise paramétrica foi realizada utilizando o teste não pareado. Os resultados são mostrados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A abordagem não paramétrica foi atendida utilizando o teste de Mann-Whitney. Os resultados são mostrados como mediana (mínimo – máximo). Diferença estatística significativa foi considerada quando $P < 0,05$. A curvas de sobrevivência foram realizadas

empregando o teste de Kaplan - Meier. Diferença estatística significativa considerada quando $p < 0,05$. O pacote estatístico empregado foi GraphPad Prism Versão 9.3.0.

RESULTADOS

Ao analisar as fichas dos pacientes foram constatados um total de 200 cães sendo que 25 eram machos e 175 fêmeas, a idade média de $8,01 \pm 3,55$ anos de 184 casos de cães analisados.

Com referência a raça dos caninos, notou-se a prevalência em 199 que apresentava-se os dados 44,22% animais sem raça definida (SRD), 29,64% para a raça pit bull, 6,53% para boxer, 3,51 para dálmata, 2,51% para o fox paulistinha, 2,01% para o poodle, 1,50% para dogue alemão, dogo argentino e para o schnauzer, 1,0% para o lhasa apso e 0,5% foram para cada espécie akita, pastor alemão, beagle, bull terrier, cocker, fila brasileiro, labrador, pastor belga, pequinês, pinscher, weimaraner e teckel.

Quanto a coloração da pelagem e localização das lesões nos pacientes caninos segue a Tabela 1 referente aos dados.

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes caninos avaliados no estudo referente a coloração da pelagem e localização da lesão referente a quantidade analisada

Coloração pelagem	Quantidade
Branca	61/179
Branco e preto	41/179
Branco e marrom	36/179
Marrom	17/179
Preto	11/179
Preto e marrom	5/179
Cinza,	4/179
Branco, preto e marrom	3/179
Branco e cinza	1/179
Localização anatômica	Quantidade
Abdominal	78/200
Peniana	39/200
Inguinal	16/200
Membro	12/200
Tórax	11/200
Testicular e pálpebra	9/200
Plano nasal	4/200
Digito	3/200
Pina e para a lombar	3/200
Abdominal e tórax	2/200
Face, perianal	2/200
Perianal	2/200
Abdominal e inguinal	1/200
Abdominal e pálpebra	1/200
Cauda	1/200
Cervical, dígito e face	1/200
Pina e face	1/200

Quanto a classificação histopatológica os pacientes caninos apresentaram 64,5% carcinoma bem diferenciado, 25% carcinoma moderadamente diferenciado, 7,5% carcinoma pouco diferenciado, 2,5% ceratose actínica e 0,96% e um paciente apresentado ceratose e carcinoma bem diferenciado.

Referente aos tratamentos dos 199 pacientes diagnosticados de cães 71,35% foram nodulectomia, 14,08 % penectomia, 3,0% amputação de membro, 2,51% biópsia para diagnóstico, 1,92% para ablação de conduto e pina; crioterapia; nodulectomia mais crioterapia; nodulectomia mais enucleação; rinotomia, 0,96% conchectomia; enucleação; nodulectomia mais penectomia; nodulectomia mais enucleação.

Dos casos clínicos analisados para os cães foram observados 59 casos da sobrevida global (do dia do diagnóstico até o dia do óbito) isto é, com uma média de $1,49 \pm 1,94$ anos. Os pacientes diagnosticados e considerando até a data de 31 de julho de 2024 foram observados 20 casos de sobrevida (entre a data do diagnóstico até a data sem óbito), o qual apresentou uma média de $2,01 \pm 1,87$ anos. Dentre os 200 casos analisados, 31 apresentaram recidiva.

Ao analisar a sobrevida dos casos de cães (Figura 1) constatou-se que a maior sobrevida foi para o carcinoma moderadamente diferenciado. Já para os casos de felinos a maior sobrevida foi para o carcinoma bem diferenciado e apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao carcinoma moderadamente diferenciado.

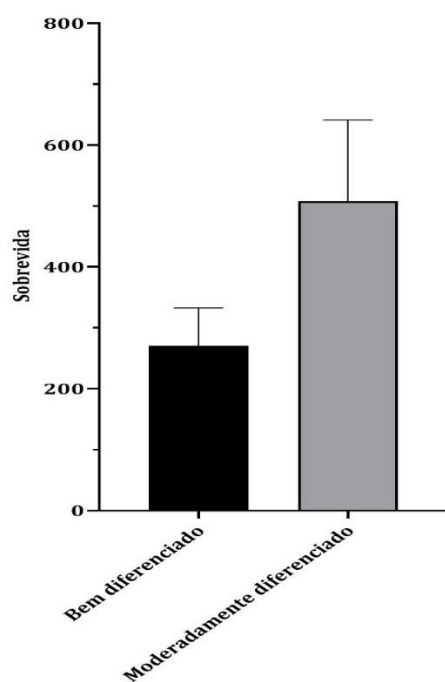


FIGURA 1. A. Sobrevida de paciente caninos com diferenças dos carcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados.

Para a análise de sobrevida dos pacientes de cães Figura 2, com relação a classificação ceratose actínica, carcinoma pouco, moderadamente e bem diferenciado, não foi constatada diferença estatisticamente significativa.

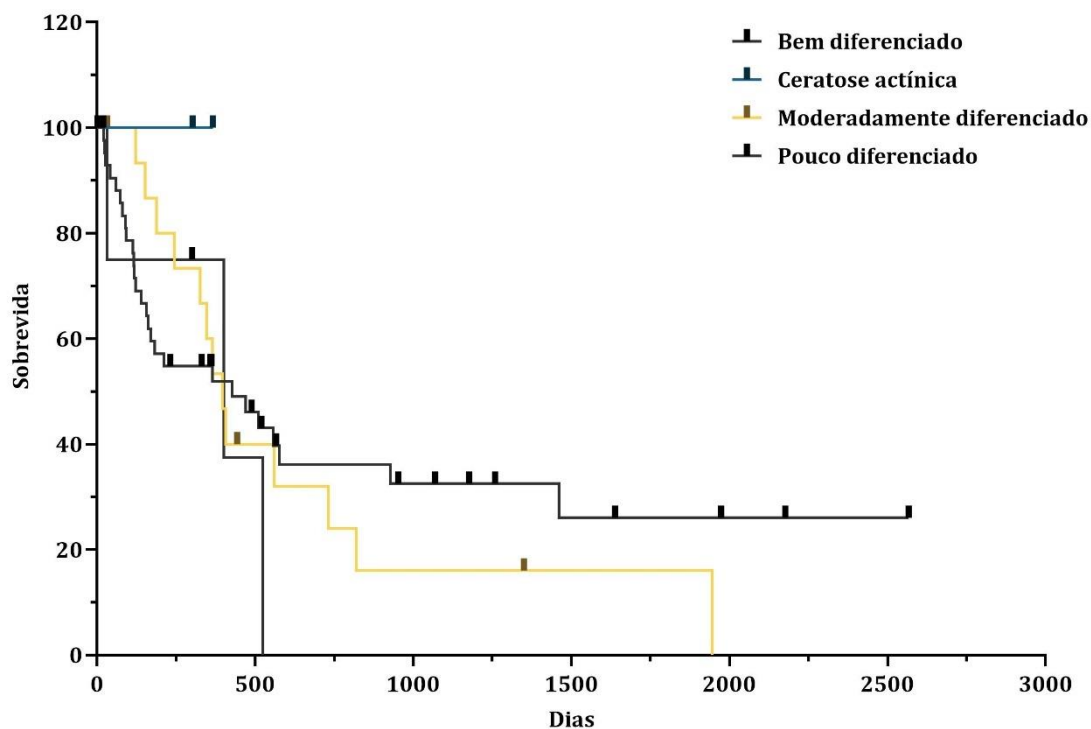


FIGURA 2. Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier estimando a sobrevivência de cães em relação a classificação do CCEs.

Os felinos analisados foram 104 gatos sendo 34 machos e 70 fêmeas. Com a idade média de $9,43 \pm 4,08$ anos para 90 amostras de gatos. As principais raças de felinos dos 103 foram de 96,11% para sem raça definida (SRD) e 1,94% para a raça angorá e para o persa.

Para os felinos a coloração da pelagem e localização apresentada segue na Tabela 2.

TABELA 2. Informações clínicas dos pacientes felinos avaliados no estudo referente a coloração da pelagem e localização da lesão referente a quantidade analisada

Coloração pelagem	Quantidade
Branca	19/96
Branco e preto	19/96
Branco e cinza	11/96
Branco, preto e marrom	9/96
Marrom	8/96
Branco e marrom	6/96
Cinza	2/96
Preta	2/96
Localização anatômica	Quantidade
Pina	39/104
Plano nasal	28/104
Pálpebra	13/104
Face	9/104
Labial	3/104
Abdominal	2/104
Pina e pálpebra	2/104
Plano nasal e lábio	2/104
Digito	1/104
Membro	1/104
Face e pina	1/104
Ouvido	1/104
Pina e lábio	1/104
Plano nasal e pálpebra	1/104
Plano nasal e pina	1/104

Para os pacientes felinos 55,76% apresentaram carcinoma bem diferenciado, 24,03% carcinoma moderadamente diferenciado, 12,5% carcinoma pouco diferenciado, 3,84%ceratose actínica mais carcinoma bem diferenciado, 1,92% ceratose actínica, (1/104) carcinoma bem diferenciado mais pouco diferenciado, 0,96%ceratose mais carcinoma moderadamente diferenciado.

Para os tratamentos dos pacientes felinos 37,25%para conchectomia, 18,62% nodulectomia, 16,66% biópsia, 11,76%nosectomia, 3,92% crioterapia, 1,96% conchectomia mais nosectomia; conchectomia mais enucleação; eletroquimioterapia, (1/102) amputação de dígito; enucleação; mandibulectomia; maxilectomia; nodulectomia mais crioterapia; nodulectomia mais enucleação.

Para os dados clínicos de felinos foram observados 43 casos da sobrevida global (do dia do diagnóstico até o dia do óbito) isto é, com uma média de $1,28 \pm 1,64$ anos. Os pacientes diagnosticados e considerando até a data de 31 de julho de 2024 foram observados 7 casos de sobrevida (entre a data do diagnóstico até a data sem óbito), o qual apresentou uma média de $2,54 \pm 2,46$ anos. Dentre os 104 casos analisados, 15 apresentaram recidiva.

Já para os casos de felinos a maior sobrevida foi para o carcinoma bem diferenciado e apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao carcinoma moderadamente diferenciado (Figura 3).

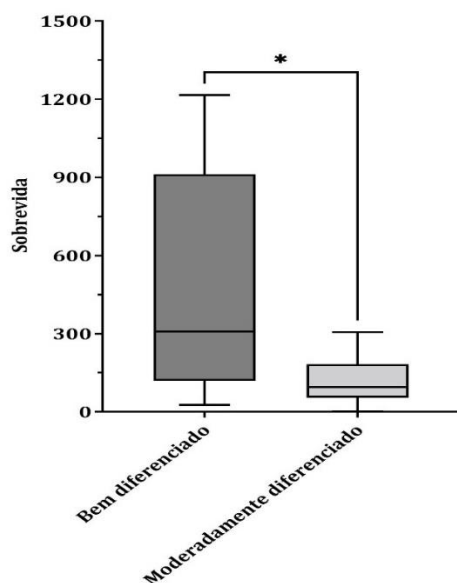


FIGURA 3. Sobrevida de paciente felinos com diferenças dos carcinomas bem diferenciados e moderadamente diferenciados, demonstrado diferença estatística $p < 0,05$ pelo teste de Letras minúsculas compararam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Para a análise de sobrevida dos gatos Figura 4, com relação a classificação ceratose actínica, carcinoma pouco, moderadamente e bem diferenciado apresentando que para os pacientes a sobrevida não foi constatada diferença estatisticamente significativa.

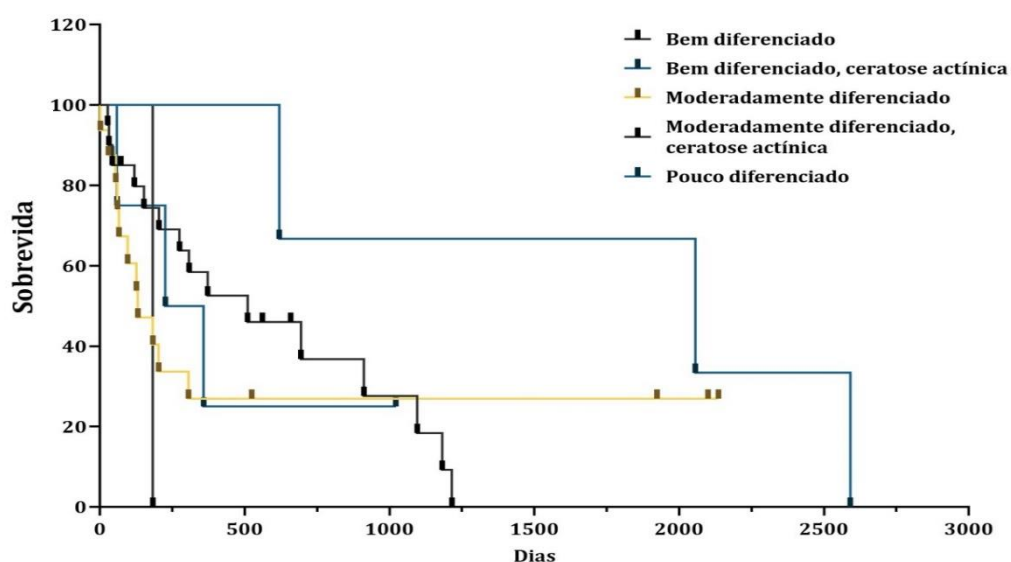


FIGURA 4. Curvas de sobrevivência de Kaplan – Meier estimando a sobrevivência de felinos em relação a classificação do CCEs.

DISCUSSÃO

A importância dos estudos retrospectivos referente ao atendimento de pacientes de cães e gatos apresentando ceratose actínica e CCEs podem contribuir para uma melhor identificação, interpretação da evolução e caracterizando o prognóstico da doença. Ao analisar as neoplasias cutâneas de origem epitelial de cães e gatos, o CCEs apresentou um valor de 5% e 23% dos tumores estudados em cães e gatos respectivamente (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992). Já em estudo realizado por Meirelles et al (2010) e Souza et al (2006), o CCEs representaram 7% dos casos em cães no Rio Grande do Sul.

Para as idades apresentadas dos casos de cães e gatos foram constatadas uma idade média de $8,01 \pm 3,55$ e $9,43 \pm 4,08$ anos respectivamente. Uma possível explicação para o surgimento de ceratose actínica e o CCEs é devido a sua etiologia multifatorial e ao aumento da expectativa de vida dos animais (ROSOLEM, et al., 2012; GREEN; OLSEN, 2017). Este fato é corroborado por Goldschmidt; Goldschmidt (2017) que também relaciona o risco de animais idosos com o desenvolvimento de CCEs, com pico de incidência de 6 a 13 anos em cães e de 9 a 14 anos em gatos.

De acordo com Manuali et al (2020) e Guisado et al (2021) ao estudarem os tumores malignos cutâneos em gatos, constataram que as ocorrências destas doenças estão relacionadas a idade com surgimento das lesões foi em torno de 10 a 11 anos. Para as raças de cães analisadas, observou-se a prevalência da doença ceratose actínica e o CCEs para os animais sem raça definida (SRD), no entanto, para outras raças de cães como no pit bull, boxer e dálmata foram observados as ocorrências das doenças. Em estudos realizados por Gross et al (2009) e Rodaski; Werner (2009) constataram a ocorrência da prevalência do CCEs em raças como dálmata, pit bull terrier, dogue alemão, beagle, boxer, poodle e dachshund.

Ao considerar as raças felinas, verificou-se que a prevalência da doença ceratose actínica e o CCEs para os animais sem raça definida (SRD) e com menor ocorrência para a raça angorá e persa. Dentre as raças estudadas na literatura, a persa, himalaio, siamês e birmanesa possuem um risco reduzido de

desenvolver o CCEs em relação aos felinos (SRD), além disso, a cor da pelagem raramente é registrada nesses casos, o que dificulta a correlação entre o grau de pigmentação e a probabilidade de desenvolvimento tumoral (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; HO et al., 2018).

Quanto a descrição da coloração da pelagem dos animais analisados tanto para caninos e felinos a ocorrência são para os animais que apresentaram uma pelagem despigmentada ou características parcialmente despigmentada como por exemplo branco e preto; branco e cinza; branco e marrom.

Animais que apresentam pelagem curta, clara e com pouca pigmentação notou-se uma predisposição ao desenvolvimento do CCEs (GROSS et al., 2009). Como um dos fatores da doença multifatorial, pode ser explicado pela região geográfica, ou seja, latitudes meridionais está mais sujeita à exposição prolongada à luz ultravioleta, sendo descrita a geografia quanto a despigmentação da pele influenciam no desenvolvimento do CCEs nos felinos (MANUALI et al., 2020; HO et al., 2018).

A localização da manifestação das lesões nos pacientes pode estar associada a maior incidência dos raios ultravioletas, nas regiões abdominal e peniana para os pacientes caninos, devido a seus hábitos, consequentemente a exposição destas regiões. Já para os felinos, constatou-se que as regiões com maior incidência do CCEs, estão relacionadas na região facial, de pina e plano nasal, isto é, devido ao comportamento do felino. Estes fatos podem ser corroborados aos estudos de Goldschmidt; Goldschmidt (2017) que descrevem a localização das lesões do CCEs em cães, comumente na cabeça, abdômen, membros torácicos e pélvicos, além de períneo e dígitos (ungueal). Nos felinos há uma maior predileção para as pinas, plano nasal e, em menor frequência, as pálpebras e lábios (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; GROSS et al., 2009).

A classificação histopatológica dos pacientes foi descrita conforme as variações quanto aos seus aspectos histológicos, classificado de acordo com Goldschmidt; Goldschmidt (2017). Considerando essa classificação histopatológica nos pacientes neste estudo retrospectivo,, no entendimento da

gravidade da doença, ou seja, foi possível entender a agressividade da manifestação e consequentemente fornecendo uma base para o prognóstico.

Os principais tratamentos instituídos no tratamento do CCEs neste estudo, incluíram a nodulectomia e a penectomia, foram os procedimentos com maior casuística para os pacientes caninos. De acordo com Torres et al (2023) os tratamentos para o CCEs são variados, e incluem desde cirurgia, criocirurgia, radiação ionizante, terapia fotodinâmica a quimioterapia sistêmica e tópica.

Nos felinos os principais tratamentos relatados foram a conchectomia e nodulectomia também descrito por Murphy (2013), o qual relata a utilização da conchectomia no tratamento de felinos com lesões em pinas. A nodulectomia ou a excisão completa do CCEs pode depender da variável em relação ao seu tamanho e a sua localização anatômica, em que lesões pré-neoplásicas e a remoção do CCEs podem contribuir para evolução do desenvolvimento do CCEs (WEBB et al., 2009; WITHROW, 2017).

Ao analisar a sobrevida dos pacientes caninos constatou-se que após o diagnóstico as lesões na região abdominal apresentaram uma sobrevida de 582 dias para animais sem raça definida (SRD), e para a região peniana a sobrevida foi de 348 dias para a raça pit bull. De acordo com Willcox et al (2018) ao analisarem pacientes caninos sem alteração actínicas, a média de sobrevida foi de 680 dias, comparado com tempo médio de sobrevida com alteração actínica associada com mediana de 1359 dias.

Para os felinos a região da pina apresentou uma sobrevida de 519 dias para animais sem raça definida (SRD), quando acometidos e na região de plano nasal apresentaram uma sobrevida de 458 dias para SRD. Estas informações são corroboradas por Murphy (2013) em seu estudo constatou gatos com lesões apenas na orelha tiveram tempos de sobrevivência mais longos (799 dias) do que gatos com lesões apenas no plano nasal (675 dias). Gatos com lesões tanto no plano nasal quanto na orelha tiveram os tempos de sobrevivência mais curtos (530 dias).

CONCLUSÃO

O estudo retrospectivo pode ser uma ferramenta que auxilia na importância da compreensão do padrão de manifestação em cães e gatos da ceratose actínica e do CCEs. Sendo que o perfil de pacientes analisados apresentando uma pelagem clara avançada.

AGRADECIMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.S.; CAVALCA, A.M.B.; ALVES, C.E.F. A Critical Review of the risk factors associated with Canine Squamous Cell Carcinoma development. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2022. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v15i1p1-10.

CEDENO QUEVEDO, D.A; MORALES, T.G; JERALDINE MERA SOLARTE, J.M; OLIVA, C.A.C Estudio retrospectivo del carcinoma de células escamosas en bovinos en el departamento de Nariño, Colombia. **Rev. Med. Vet. Bogotá (Colombia)**, v. 39: p. 75-84, 2019. DOI:10.19052/mv.vol1.iss39.8

GOLDSCHMIDT, M.H.; SHOFER, F.S. 1992. **Skin tumors of the dog and cat**. Oxford: Pergamon, p.316.

GOLDSCHMIDT MH, GOLDSCHMIDT KH. Epithelial and Melanocytic Tumours of the Skin. In: Meuten DJ, ed. Tumours of domestic animals. 5th ed. Ames, IA: John Wiley and Sons; 2017: 89-102

GROSS TL, IHRKE PJ, WALDER EJ, AFFOLTER VK. Skin Diseases of the Dog and Cat: **Clinical and Histopathologic Diagnosis**. 2th ed. Ames, IA: Blackwell Science Ltd; p. 581-588, 2005

GROSS TL, IHRKE PJ, WALDER EJ, AFFOLTER VK. **Doenças de pele do cão e do gato: 347 diagnóstico clínico e histopatológico**, 2th Edit, Ed, Roca, São Paulo, p. 837-842, 2009.

GUISADO, F.R.; SUÁRES-BONNET, A.; RAMÍREZ, G. Cutaneous Spindle Cell Squamous Cell Carcinoma in Cats: Clinical, Histological, and Immunohistochemical Study. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 3, p. 503-507, 2021. DOI: 10.1177/0300985820985126

HO, N.T.; SMITH, K.C.; DOBROMYLSKYJ, M.J. Retrospective study of more than 9000 feline cutaneous tumours in the UK: 2006-2013. **Journal of feline medicine and surgery**, v.20, n.2, p. 128-134, 2018. DOI: 10.1177/1098612X17699477.

KARLSSON E.; TENORIO, G.P.; AMIN, R.; BOSTNER J.; SKOOG, L.; FORNANDER, T.; SGROI, D.C.; NORDENSSKJOLD B.; HALLBECK, A.L.; STAL, O. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomized Stockholm tamoxifen trials. **Breast cancer research**, v.15, n.5, 2013. DOI: 10.1186/bcr3557.

MANUALI, E.; FORTE, C.; VICHI, G.; GENOVESE, D.A.; MANCINI, D.; LEO, A.A.P.; CAVICCHIOLO, L.; PIERUCCI, P.; ZAPPULLI, V. Tumours in European shorthair cats: a retrospective study of 680 cases. **Journal of feline medicine and surgery**, v.22, n.12, p. 1095-1102, 2020. <https://doi.org/10.1177/1098612X20905035>.

MURPHY, S. Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. **Journal of feline medicine and surgery**, v.15, n.5, p. 401-407, 2013. DOI: 10.1177/1098612X13483238.

PRADO, L.O.C.; ROSETTO, V.J.V.; CARVALHO, L.M.C.R.; FERREIRA, A.P.; MATSUBARA, L.M.; RODRIGUES, J.C.Z.; BRANDÃO, C.V.S. Evaluation of the cryosurgery for treatment of squamous cell carcinoma in cats. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.69, n.4, p. 877-882, 2017. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9060>.

RODASKI, S.; WERNER, J. Neoplasias de Pele. In: Daleck, C.R.; De Nardi, A.B.; Rodaski, S. **Oncologia em cães e gatos**: ed.1, Roca: São Paulo, p.258-261, 2009.

ROSOLEM, M.C.; MOROZ, L.R.; RODIGHERI, S.M. Carcinoma de células escamosas em cães e gatos: Revisão de literatura. **PUBVET**, v. 6, n. 6, p. 1-17, 2012

SANZ RESSEL, B.L.; MOLINOLO, A.A. Immunohistochemical Techniques for Phosphoproteins. **Signal Transduction Immunohistochemistry**, v. 2593, p. 259-264, 2023. DOI:10.1007/978-1-0716-2811-9_17.

SOUZA, T.M; FIGHERA, R.A; IRIGOYEN, L.F; LOMBARDO DE BARRO, C.S. Retrospective study on 761 canine skin tumors **Patologia. Cienc. Rural**, v. 36, (2) Abr 2006. DOI: 10.1590/S0103-84782006000200030

TORRES, L.E.C.; LOPEZ, A.E.G.; PRADO, R.G.S.; ARÉVALO, G.M.A.; PIRES, C.R.S. Carcinoma de células escamosas em gato – tratamento com quimioterapia metronômica, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 51, p. 1-5, 2023.

WEBB A.J. & CALHOUN M.L. 1954. The microscopic anatomy of the skin of mongrel dogs. **Am. J. Vet. Res.** 15:274-280.

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE FELINOS

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCEs) é considerado um tumor maligno cutâneo que acomete felinos. O CCEs apresenta maior frequência em gatos de pelos claros, que residem em países tropicais. Apesar da importância do CCEs nessa espécie, poucos estudos investigaram a desregulação de diferentes proteínas nesses tumores. Portanto, o presente estudo teve por objetivo investigar a alteração da expressão de S6K1 (proteína ribossômica S6-quinase-1) e p-4E-BP1 (proteína 1 de ligação a 4E fosforilada) em amostras de CCEs em felinos. A desregulação dessas proteínas no processo carcinogênico foi avaliada em amostras de biópsia que apresentaram transição morfológica do epitélio normal, para ceratose actínica e CCEs. Lâminas de hematoxilina e eosina foram revisadas, e 20 casos foram incluídos nesse estudo apresentando a transição morfológica na mesma amostra. A alteração da expressão de S6K1 e p-4E-BP1 na ceratose actínica e no CCE para ambos os marcadores nos pacientes felinos demonstrando ativação da via da via mTOR. Conclui-se que a expressão dessas proteínas na via pode ser um potencial alvo de estudo no desenvolvimento terapêutico dos felinos.

Palavras chave: ceratose de actínica, S6K1 e p-4E-BP1, expressão da proteína

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is considered a malignant skin tumor that affects felines. SCC is more frequent in light-haired cats living in tropical countries. Despite the importance of SCC for felines, few studies have investigated the dysregulation of different proteins in these tumors. Therefore, the present study aims to investigate the alteration in the expression of S6K1 (ribosomal protein S6-kinase-1) and p-4E-BP1 (phosphorylated 4E-binding protein 1) in SCC samples in felines. The dysregulation of these proteins in the carcinogenic process was evaluated in biopsy samples that showed morphological transition from normal epithelium to actinic keratosis and SCC. Hematoxylin and eosin slides were reviewed, and 20 cases were included in this study showing the morphological transition in the same sample. The alteration of the expression of S6K1 and p-4E-BP1 in actinic keratosis and SCC for both markers in feline patients demonstrates activation of the mTOR pathway. It is concluded that the expression of these proteins in the pathway may be a potential target of study in the therapeutic development of felines.

Keywords: actinic keratosis, S6K1e p-4E-BP1, protein expression

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCEs) é considerado um tumor cutâneo maligno (SOBRINHO et al., 2022), cuja etiologia é considerada multifatorial e envolve predisposição genética, exposição à fatores físicos e químicos, exposição à luz ultravioleta, infecção por papilomavírus, diferenças genômicas, mutações de alguns genes e alterações na expressão de proteínas (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; ALVES et al., 2022).

A progressão clínica da ceratose actínica se difere do CCEs por meio de avaliação do exame histopatológico, sendo que o CCEs vai apresentar localmente invasivo e com o crescimento lento, alguns casos propensos à recidiva, as taxas de metástase apresenta-se baixa, porém podendo ocorrer em linfonodos regionais como em pulmões e ossos (SOBRINHO et al., 2022; ALVES et al., 2022).

O estudo de biologia molecular realizado com CCEs felinos permanece escasso na literatura, em comparação com os métodos tradicionais, como citologia, histopatologia e imuno-histoquímica. Uma das formas para contornar essas dificuldades pode ser pela aplicação e estudo da via PI3K/AKT/mTOR.

A via PI3K/AKT/mTOR tem sido associada ao carcinoma de células escamosas de diferentes localizações em humanos, incluindo, pele, cavidade oral e cérvix (GHAFOURI-FARD et al., 2022). No entanto em gatos, não foram encontrados estudos que avaliaram a expressão dessas proteínas na progressão do CCEs.

A proteína S6K1 é reguladora central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese. Em contrapartida, o S6K1 quando é fosforilado (p-S6K1), torna a forma ativa da proteína S6K1 e está relacionado a um prognóstico ruim e à resistência à terapia endócrina humana (KIM et al., 2017). A fosforilação de 4EBP1 por mTORC1 promove a dissociação de 4EBP1 de EIF4E, permitindo que EIF4E induza a tradução de proteínas. Consequentemente, 4EBP1 fosforilado (p-4E-BP1) é aceito como um marcador de sinalização da via mTOR (KARLSSON et al., 2013).

Diante deste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o padrão de expressão dos marcadores S6K1, p-4E-BP1 da via mTOR na transição

morfológica do epitélio normal, ceratose actínica e do CCEs em amostras de CCEs cutâneo de felinos, para ajudar a elucidar se a via de transição apresenta relação entre os marcadores e a doença.

MATERIAL E MÉTODO

Design do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo não randomizado que incluiu amostras de felinos previamente diagnosticado com carcinoma de células escamosas (CCEs), que apresentava na mesma amostra a área de transição entre epiderme normal, ceratose actínica e CCEs. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista – Unesp-Botucatu sendo o protocolo CEUA 1005/2024.

Crítérios de inclusão e exclusão

Foram analisados 20 casos de biópsia de felinos diagnosticadas com carcinoma de células escamosas, do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da Unesp – Botucatu do período de 01/01/2008 até 31/07/2024. As amostras incluídas no estudo, apresentavam como critério, na mesma amostra a presença epiderme normal, ceratose e carcinoma, os dados clínicos dos animais incluam: raça, sexo, idade, coloração da pelagem, localização das lesões e tratamento realizado. Foram excluídas, amostras nos quais o bloco de parafina não apresentava quantidade suficiente de tecido para análise de imuno-histoquímica ou que não apresentava na mesma amostra transição.

Avaliação histológica

Mesmo com diagnóstico prévio, as amostras foram novamente analisadas, através da coloração de hematoxilina e eosina (HE) para verificar se apresentavam epiderme normal, ceratose actínica e CCEs na mesma amostra. A classificação histomorfológica do CCEs, foi realizada de acordo com os critérios de Müller e Kirk's (2012), e foram classificados em CCEs bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados.

Avaliação imuno-histoquímica

A análise de imuno-histoquímica foi realizada utilizando o anticorpo S6K1(Abcam) e p-4E-BP1 (Cell signalig rabbit) em cortes histológicos obtidos à espessura de 4 µm, que foram distendidos sobre lâminas com carga positiva (Starfrost®, Knittel, Braunschweig, Alemanha). Após realizar as secções, os cortes foram secos à temperatura ambiente e, em seguida, mantidos à temperatura de 56°C durante 12 horas. Os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais de xilol, reidratados em banhos sequenciais de etanol e lavados em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com reagente comercial específico, pronto para uso, durante 15 minutos (Dako Dual Endogenous Enzyme Block). A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão citrato, pH 6,0, em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), durante 20 minutos e com resfriamento em 20 minutos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação por 20 minutos, realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em álcool metílico. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite desnatado em pó (caseína). A diluição inicial de cada anticorpo primário foi realizada 1:500 para os anticorpos S6K1 e 4EBP, com incubação overnight. A incubação do anticorpo secundário foi realizada com um kit comercial EnVision FLEX®, High pH e posteriormente colocado o cromógeno (3,3'-diaminobenzidina). Todos os cortes foram corados com hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram realizados incubando as amostras com a imunoglobulina do anticorpo primário. O controle positivo foi realizado de acordo com as recomendações do *The Human Protein Atlas*.

Por fim, os cortes foram corados com hematoxilina, por um minuto, lavados, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula histológica para posterior avaliação à microscopia óptica. Análise das lâminas foi realizada com escore através da avaliação semiquantitativa.

Para avaliação da imuno-histoquímica foi realizada uma análise quantitativa, sendo que o número das células epidérmicas positivas foi expresso em escala de pontuação: no qual 0 apresentava menos de 10% de células

coradas; 1 entre 10-25%; 2 entre 25-50%; 3 entre 50-75% de 4 entre 75 -100% de células coradas (MOLINOLLO et al., 2016).

Análise estatística

As análises estatísticas, realizadas neste estudo, foram apropriadas para dados não paramétricos, uma vez que os resultados são expressos em escores obtidos a partir da leitura das lâminas. As comparações dentro de cada marcação imuno-histoquímica (S6K1 e p-4E-BP1) entre as subclassificações (normal, ceratose, carcinoma pouco, moderadamente e bem diferenciados) foram conduzidas utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do ajuste de Dunn para comparações múltiplas.

Para comparações entre as marcações imuno-histoquímicas dentro de cada subclassificação, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com $p < 0,05$ e estão indicadas por letras minúsculas distintas. Os resultados são mostrados como mediana (Q1 – Q3). Todas as análises estatísticas e a elaboração das figuras foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.3.0).

RESULTADOS

Dados clínicos

As informações clínicas consideradas neste estudo incluíram: raça, sexo, idade, coloração da pelagem, localização das lesões e tratamento realizado, conforme descrito na Tabela 1.

Ao analisar os dados amostrais na Figura 1, a respeito do sexo dos felinos, 50% de pacientes machos e 50% fêmeas. A idade média dos felinos analisados foi de 8,15 anos $\pm$ 4,54 a a pelagem constatada dos pacientes foram: branca (10/20), amarelo (1/20), branco com amarelo (2/20), branco e cinza (3/20), branco e preto (4/20).

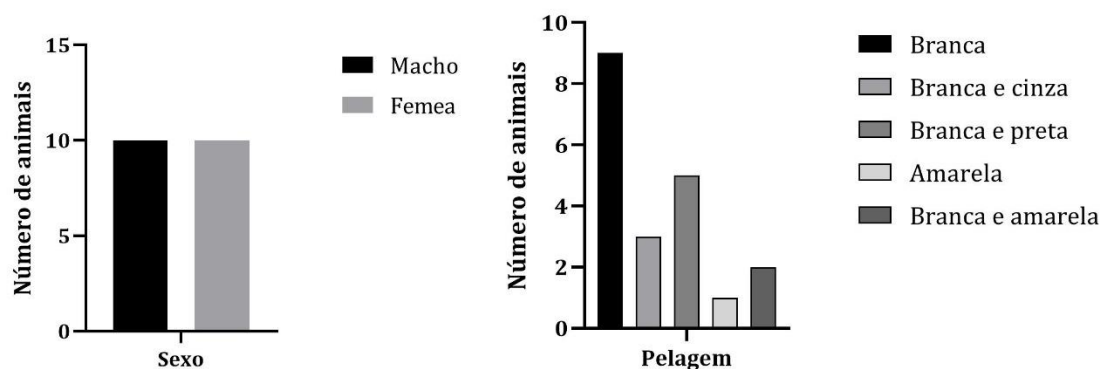


FIGURA 1. A. Relação entre os felinos e o sexo B. Relação entre a quantidade de felinos e característica da pelagem

A localização das lesões na Figura 2, foi demonstrada principalmente em pinas (10/20) sendo que desses casos um deles apresentava também lesão região, pálpebra (2/20) face (4/20) plano nasal (4/20) Sendo as raças de felinos mais acometidas foram: sem raça definida (18/20), seguido por angorá (1/20) e persa (1/20).

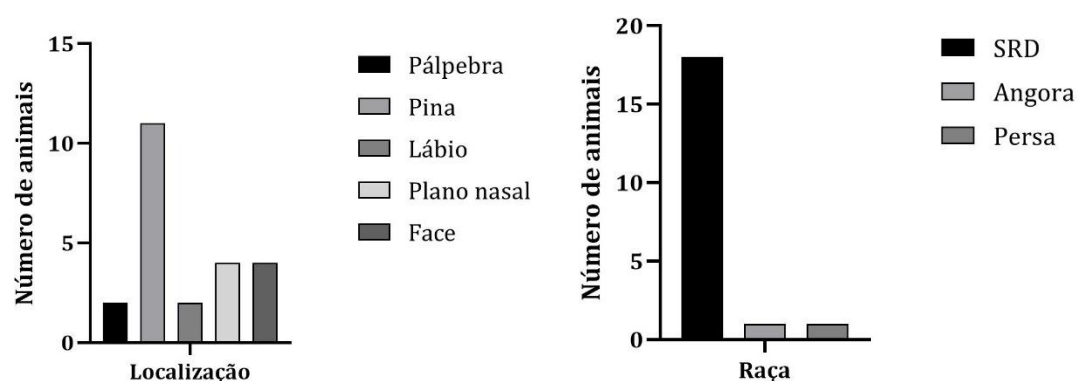


FIGURA 2. A. relação entre felinos e a localização das lesões. B. Principais raças de felinos apresentados

Casos de felinos descritos que apresentavam carcinoma pouco diferenciado foram (3/20), moderadamente diferenciado (7/20) e muito diferenciado (10/20). Ao analisar a marcação imuno-histoquímica (S6K1 e p-4E-BP1) nas amostras de área de transição da doença em felinos constatou-se, que os marcadores analisados apresentaram diferenças estatisticamente significativas no S6k1 ocorrendo uma diferença entre a marcação do epitélio normal para o carcinoma (Figura 3).

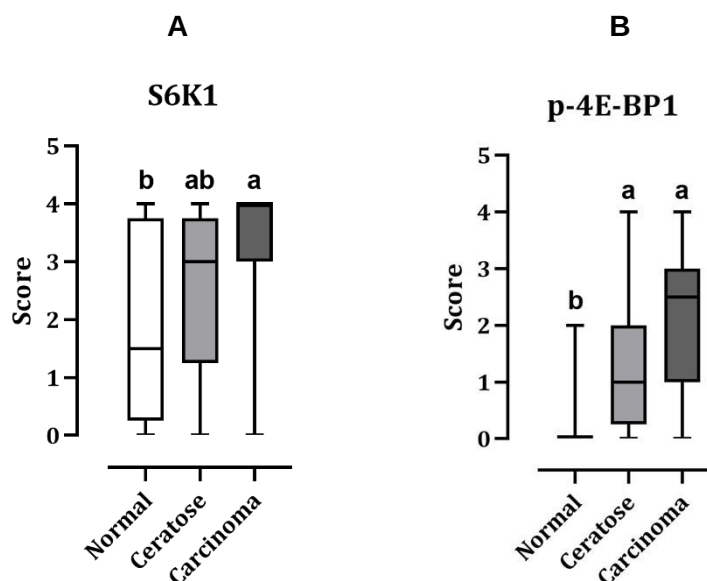


FIGURA 3. A. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores S6K1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma B. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores p-4E-BP1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma. Letras minúsculas comparam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Quando comparado o marcador p-4E-BP1 para a ceratose e para o carcinoma diferem-se estatisticamente do normal, já para o marcador S6K1 apenas o carcinoma diferiu-se em relação ao normal. Ao considerar o score para o marcador S6K1 o carcinoma apresentou o maior score quando comparado a ceratose e ao normal. Já para o score do marcador p-4E-BP1 para a ceratose e carcinoma apresentaram um escore que variou de 1 a 3.

Para a análise dos marcadores S6K1 e p-4E-BP1, Figura 4, em relação a classificação do carcinoma houve diferença estatisticamente significativa, para a classificação em carcinoma pouco diferenciado e carcinoma moderado o marcador S6K1 apresentou um score entre 3-4 e 2-4 respectivamente.

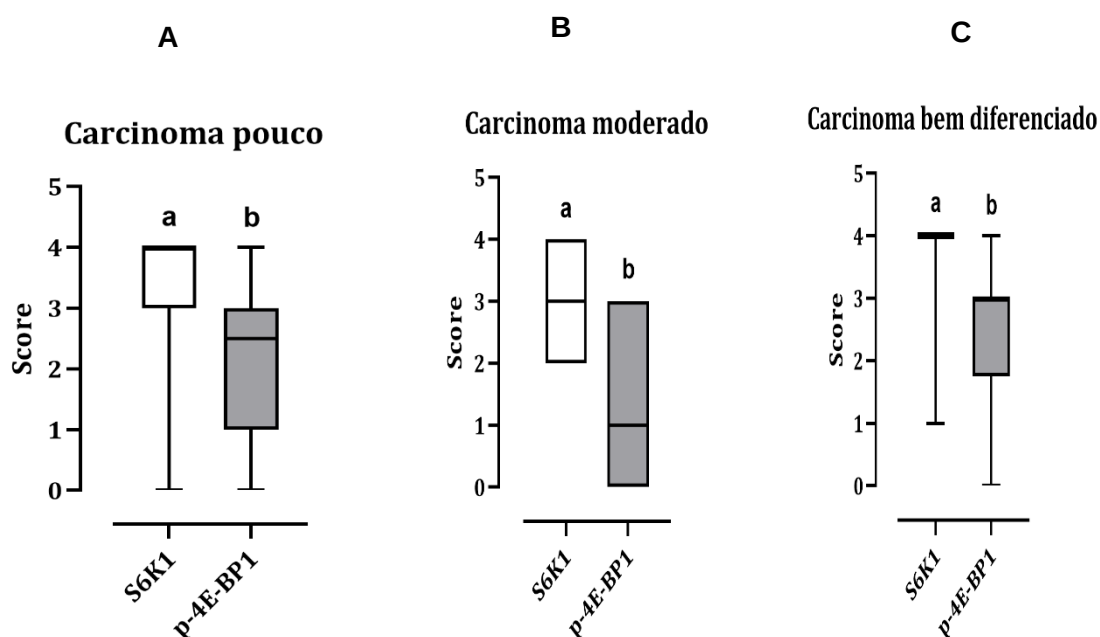


FIGURA 4. A. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma pouco diferenciado. B. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma moderadamente diferenciado. C. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma bem diferenciado. Letras minúsculas comparam os marcadores segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Na Figura 5, foram apresentados a região de área de transição conforme a relação do score para o marcador S6K1.

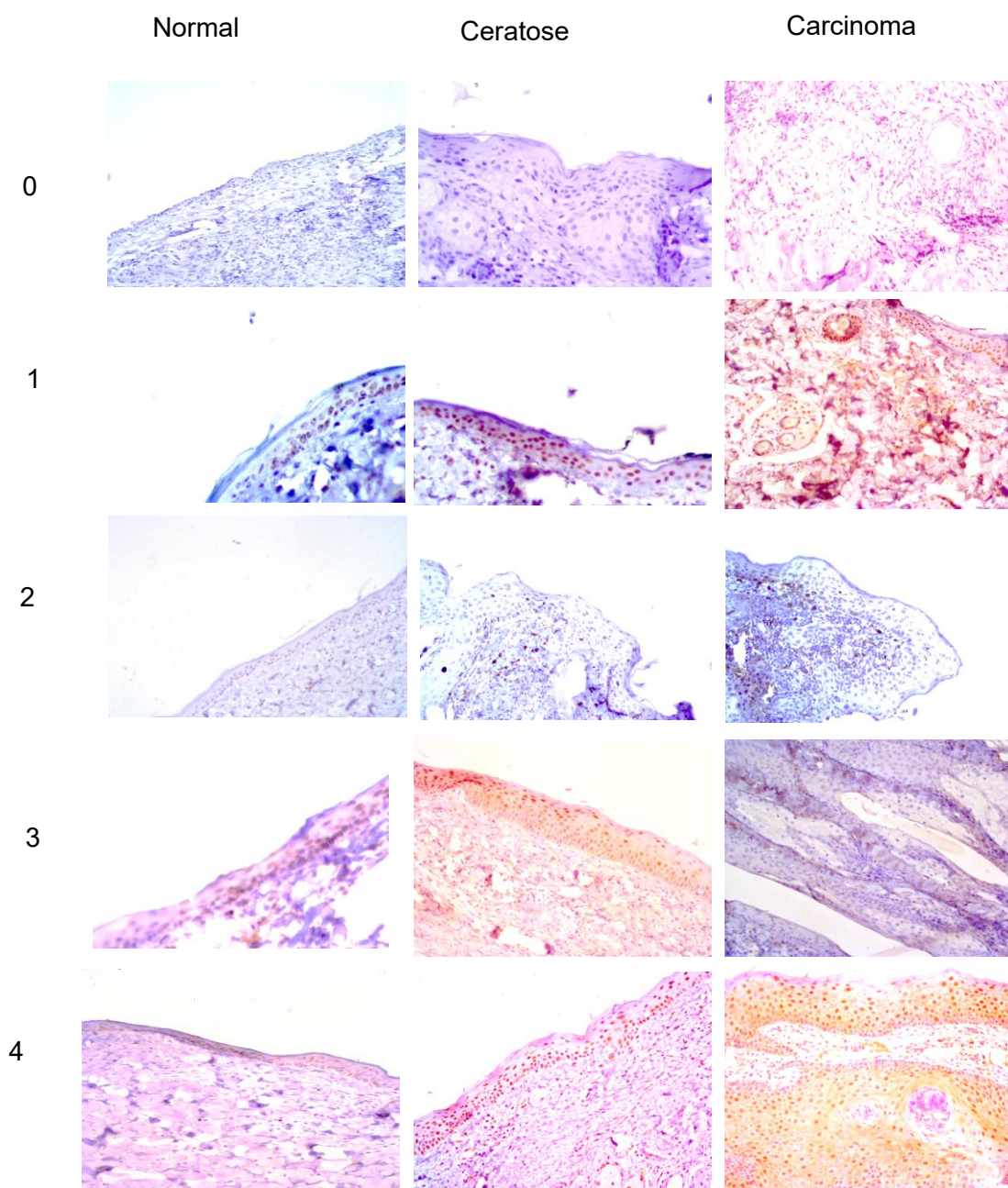


FIGURA 5. Análise quantitativa através do score conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador S6K1. Fonte: arquivo pessoal (2024).

Na Figura 6 foram apresentados a região de área de transição conforme a relação do score para o marcador p-4E-BP1. Para o score 3 e 4 na pele normal não foram constatadas marcação.

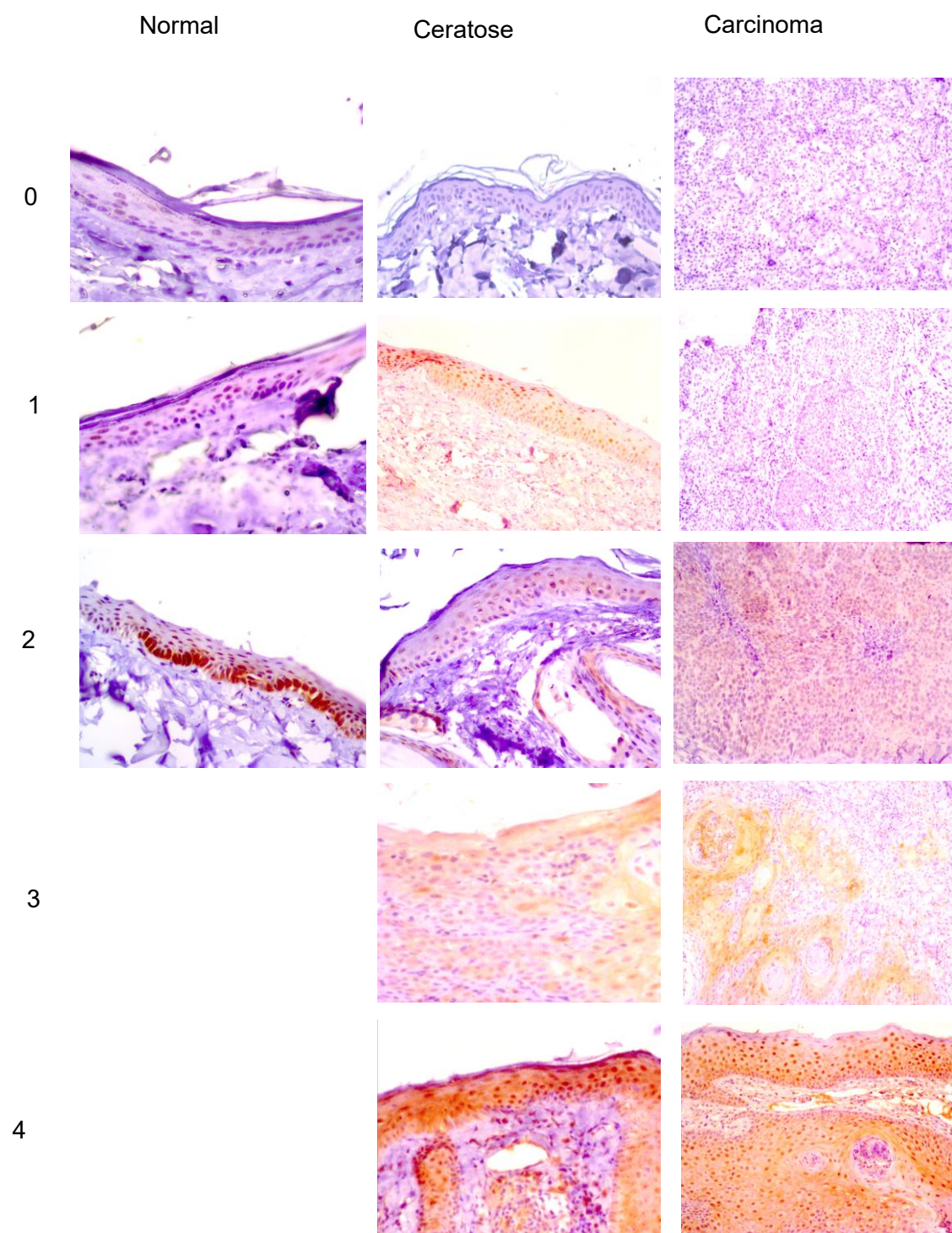


FIGURA 6. Análise quantitativa através do score conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador p-4E-BP1. Fonte: arquivo pessoal (2024).

DISCUSSÃO

A avaliação de alguns dados clínicos dos pacientes em conjunto com a análise de novos marcadores, pode fornecer uma avaliação da região de transição de pele normal, ceratose e CCEs, através de marcadores da via mTOR em felinos.

Ao considerar o sexo dos felinos, o presente estudo não mostrou diferenças estatisticamente significativas com a relação ao marcador da via mTOR. Já no trabalho realizado por Ho et al. (2018) ao analisarem os felinos, constatou-se que o sexo foi um fator significativo associado ao desenvolvimento do CCEs, embora não foi considerado nenhum marcador específico.

Para o tipo de pelagem nos felinos analisados não foi constatado diferença estatisticamente significativa, no entanto, a coloração da pelagem pode ser um indicativo da predisposição para surgimento da doença, levando em consideração o fator multifatorial da doença. De acordo com Guisado et al. (2021) a exposição à luz solar na patogênese dos tumores foi sugerida por alterações indicativas de ceratose actínica, além da localização dos tumores nas áreas dorsais e pela ausência de características histomorfológicas da infecção por papilomavírus.

A coloração da pelagem raramente é registrada nesses casos, impossibilitando determinar se existe alguma correlação entre o grau de pigmentação e a probabilidade de desenvolvimento tumoral. As raças que normalmente apresentam pigmentação mais escuram como no pavilhão auricular, pálpebras e plano nasal como a raça siamesa apresenta menor predisposição ao desenvolvimento (HO et al., 2018).

Quanto a localização das lesões apresentadas nos felinos, embora não foi constatado diferença estatisticamente significativa, de acordo com Guisado et al (2021), apresentaram lesões principalmente na região facial, pavilhão auricular (72%), área periorbital (22%) e focinho dorsal (6%).

De acordo com Gross et al (2009), Pimentel et al (2013) e Piipponen et al (2021) constataram que a supressão da proteína p53 tem sido indicativa de etiologia solar, o que colabora com o desenvolvimento de CCEs frequente em regiões despigmentadas.

Ao considerar as raças de felinos não foi verificada diferença estatisticamente significativa, apesar dos resultados apresentarem uma prevalência para os felinos sem raça definida. Já para Ho et al. (2018) os felinos sem raça definida apresentaram casuística e também descrição em persas, himalaio e siamês e a raça birmanesa apresentou risco reduzido (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT 2017).

A avaliação da imuno-histoquímica que consegue detectar em amostras fixadas em formalina e embebidas por parafina a expressão da proteína (SANZ RESSEL et al., 2023). A aplicação dessa técnica, para avaliação e determinação da superexpressão de algumas moléculas sinalizadoras, pode facilitar a progressão pela desregulação das principais funções celulares (SANZ RESSEL et al., 2019).

Uma das formas de detectar as proteínas sinalizadoras é por meio da imunodeteção onde, utiliza-se de anticorpos fosfoespecíficos da via fosfatidilinositol 3-quinase/Akt/alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/Akt/mTOR) que está frequentemente ativada em CCEs em felinos (SANZ RESSEL et al., 2021), contribuindo para a carcinogênese epidérmica e tem se mostrado um evento frequente em humanos, caninos e modelos murinos.

Ao analisar a expressão dos marcadores S6K1 e p-4E-BP1 em região de transição do epitélio normal, ceratose actínica e CCEs, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas. Sendo um possível potencial alvo, conforme já descrito por SANZ RESSEL et al (2021), indicaram esta via de sinalização como um potencial alvo terapêutico, em pacientes em felinos com CCEs, e descreveram a relação do fator de crescimento epidérmico (pEGFRTyr1068, pAktSer473, pS6Ser235/236 combinada com Ki-67, e a proteína supressora tumoral PTEN significativamente alterada em CCEs felinos e a ativação desta via de sinalização no CCEs felino permanece desconhecido, podendo fornecer uma oportunidade única para identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas para pacientes felinos com CCEs (SANZ RESSEL et al., 2021).

Como as pesquisas não apresentaram trabalhos a respeito da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, para avaliação da expressão dos marcadores S6K1, p-4E-BP1 da via mTOR, esclarecendo se essa atividade apresenta

desregulada, podendo ou não contribuir para a progressão e sinalização como um potencial alvo terapêutico em pacientes felinos com CCEs.

Os marcadores AKT fosforilado (p-AKT) quanto o p-S6K1 são marcadores substitutos para detectar a ativação da via PI3K/AKT/mTOR em humanos (KIM et al., 2017).

A via mTORC1/S6K/4E-BP1 é um importante regulador da síntese de proteínas, através da fosforilação de vários fatores, e no complexo de iniciação traducional atua principalmente no citoplasma. No entanto, recentes estudos mostraram que mTOR, bem como as quinases S6K1 e 4E-BP1 podem viajar entre o citoplasma e o núcleo, e são indicados para estarem envolvidos na regulação de transcrição. O p-4E-BP1 (fosforilado) foi considerado um marcador de sinalização mTOR ativada, com níveis elevados em alguns tumores, sendo o pior resultado principalmente em humanos, enquanto o 4EBP1 não fosforilado tem sido considerado um supressor de tumor.

A proteína ribossômica S6-quinase-1 (S6K1) atua como um regulador central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese. No câncer de mama em humanos, o S6K1 foi investigado como um marcador prognóstico, e preditivo da terapia, e está relacionado ao mau prognóstico e à resistência à terapia endócrina. O S6K1 fosforilado (p-S6K1) é uma forma ativa de S6K1 tanto o AKT fosforilado (p-AKT) são marcadores substitutos (KIM et al., 2017).

A fosforilação de 4EB-P1 por mTORC1 promove a dissociação de 4E-BP1 de EIF4E, permitindo que EIF4E induza a tradução de proteínas. O que sugere que o 4E-BP1 pode ter um papel ativo na carcinogênese. Consequentemente, 4E-BP1 também foi demonstrado para ligar e estabilizar mTORC1, promovendo a ativação de a via de sinalização (KARLSSON et al., 2013).

Em humanos a expressão da proteína p-4E-BP1e 4E-BP1 apresentou um fator prognóstico independente, prevendo diminuição da sobrevida livre de recorrência à distância e baixa sobrevivência ao câncer de mama (KARLSSON et al., 2013).

Na análise da classificação do CCEs para os felinos foram constatadas diferenças estaticamente significativas para os dois marcadores analisados na classificação carcinoma pouco, carcinoma moderadamente e carcinoma bem

diferenciado, isto é, estes dois marcadores podem ser considerados como potenciais alvos para tratamentos terapêuticos. De acordo com Sanz Ressel et al (2021), constataram que a ativação persistente de sinalização PI3K/Akt/mTOR apresentam evento chave no carcinoma felino sinalizando um potencial terapêutico.

CONCLUSÃO

A avaliação da transição morfológica do epitélio normal, ceratose e CCEs, ocorreu concomitante à alteração das proteínas da via do mTOR (S6K1, p-4E-BP1). Isso demonstra que na progressão maligna da doença, essa via pode ter papel chave no desenvolvimento do tumor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.S.; CAVALCA, A.M.B.; ALVES, C.E.F. A Critical Review of the risk factors associated with Canine Squamous Cell Carcinoma development. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2022. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v15i1p1-10.

GOLDSCHMIDT, M.H; GOLDSCHMIDT, K.H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. IN: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. fifth edition. ames, iowa : john wiley & sons inc., p. 88 – 141, 2017.

GUISADO, F.R.; SUÁRES-BONNET, A.; RAMÍREZ, G. Cutaneous Spindle Cell Squamous Cell Carcinoma in Cats: Clinical, Histological, and Immunohistochemical Study. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 3, p. 503-507, 2021. DOI: 10.1177/0300985820985126

GROSS TL, IHRKE PJ, WALDER EJ, AFFOLTER VK. **Doenças de pele do cão e do gato: 347 diagnóstico clínico e histopatológico**, 2th Edit, Ed, Roca, São Paulo, pp. 837-842, 2009.

PIIPPONEN, M.; RIIHILÄ. P.; NISSINEN, L.; KÄHÄRI, V.M. The role of p53 in progression of 376 cutaneous squamous cell carcinoma. **Cancer (Basel)**, 13, 4507. 377, 2021. DOI: 10.3390/cancers13184507

PIMENTEL, D.R.N.; ALCHORNE, M.M.A.; MICHALANY, N.S.; ABREU, MAMM.; BORRA, R.C. Reduced 378 p53 staining in actinic keratosis is associated with squamous cell carcinoma: a 379 preliminary study. **Indian Journal of Dermatology**, 58, 325-333, 2013. DOI: 10.3390/cancers13184507

HO, N.T.; SMITH, K.C.; DOBROMYLSKYJ, M.J. Retrospective study of more than 9000 feline cutaneous tumours in the UK: 2006-2013. **Journal of feline medicine and surgery**, v.20, n.2, p. 128-134, 2018. DOI: 10.1177/1098612X17699477.

KARLSSON E.; TENORIO, G.P.; AMIN, R.; BOSTNER J.; SKOOG, L.; FORNANDER, T.; SGROI, D.C.; NORDENSSKJOLD B.; HALLBECK, A.L.; STAL, O. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomized Stockholm tamoxifen trials. **Breast cancer research**, v.15, n.5, 2013. DOI: 10.1186/bcr3557.

KIM, H.A.; KIM, J.H.; CHOI, H.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J.; HAN, K.H.; SEONG, M.K.; SEOL, H.S.; NOH, W.C. Core needle biopsy specimens are more appropriate than surgical specimens for evaluating the expression of phosphoproteins as biological markers in invasive breast cancer. **Anticancer Research**, v.37, n.3, p.1409-1412, 2017. DOI: 10.21873/anticancer.11463.

MOLINOLO, A.A., HEWITT, S.M., AMORNPHIMOLTHAM, P., KEELAWAT, S., RANGDAENG, S., MENESES GARCIA, A., RAIMONDI, A.R., JUFE, R., ITOIZ, M., GAO, Y.; SARANATH, D.; KALEEBI, G.S.; YOO, G.H, LEAK, L.; MYERS, E.M.; , SHINTANI, S.; WONG, D.; MASSEY, D.; YEUDALL, A.; LONARDO, F.; ENSLEY, J.; GTKIND, J.S. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. **Clin. Cancer Res**, v. 13, p.4964–4973, 2007.

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signaling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **The Veterinary Journal**, v. 245, p. 41-48, 2019. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.12.024

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Persistent activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in cutaneous squamous cell carcinomas in cats. **Veterinary Dermatology**, v.32, n.6, p. 675-e180, 2021. DOI: 10.1111/vde.13001.

SANZ RESSEL, B.L.; MOLINOLO, A.A. Immunohistochemical Techniques for Phosphoproteins. **Signal Transduction Immunohistochemistry**, v. 2593, p. 259-264, 2023. DOI:10.1007/978-1-0716-2811-9_17.

SOBRINHO, A.V.A.; ALVES-RIBEIRO, B.S.; MORAES, I.S.; RAMOS, D.G.S.; SATURNINO, K.C. Diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em cão – relato de caso. **I Congresso Nacional de Especialidade Veterinárias**. 2022. DOI: 10.51161/convesp/7325.

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes avaliados no estudo: idade, sexo, raça, coloração da pelagem, localização da lesão, e classificação morfológica.

	Tratamento	Causa óbito	Sexo	Raça	Pelagem	Idade meses	Localização	Classificação
1	Cirúrgico	Óbito	Fêmea	SRD	Branco	120,59	Pálpebra	Pouco diferenciado
2	Conchectomia	Óbito	Macho	SRD	Branco e cinza	111,32	Pina	Moderadamente diferenciado
3	Nossectomia, Nodulectomia	Eutanásia	Macho	SRD	Branco e preta	144,66	Plano nasal	Moderadamente diferenciado
4	Conchectomia	Eutanásia	Fêmea	SRD	Branco	61,05	Pina e face	Moderadamente diferenciado
5	Conchectomia	DRC	Macho	SRD	Branco e amarela	133,41	Pina	Bem diferenciado
6	Conchectomia	Eutanásia	Fêmea	SRD	Branco	48,6	Pina	Bem diferenciado
7	Não teve tratamento	Óbito	Fêmea	SRD	Branco e preta	60,1	Plano nasal	Bem diferenciado
8	Conchectomia	Óbito	Fêmea	SRD	Branco	120,92	Pina	Bem diferenciado
9	Não teve tratamento	DRC	Fêmea	SRD	Branco	180,3	Pina	Bem diferenciado
10	Conchectomia	Óbito	Fêmea	Persa	Branco	18	Pina	Bem diferenciado
11	Conchectomia	Está bem	Fêmea	SRD	Branco	147,12	Pina	Bem diferenciado
12	Conchectomia	Não tem histórico	Macho	SRD	Branco	16	Pina	Pouco diferenciado
13	Nodulectomia	Eutanásia	Fêmea	SRD	Branco	98,58	Face	Moderadamente diferenciado
14	Conchectomia	Está bem	Macho	SRD	Branco e cinza	72,03	Pina	Bem diferenciado
15	Nodulectomia	Está bem	Macho	SRD	Branco e amarela	153,07	Pálpebra	Moderadamente diferenciado
16	Não teve tratamento	Óbito	Macho	SRD	Branco e preto	120,07	Face	Bem diferenciado
17	Não teve tratamento	Óbito	Fêmea	SRD	Branco	12,12	Face	Pouco diferenciado
18	Não teve tratamento	Óbito	Macho	SRD	Branco e cinza	180,01	Plano nasal	Moderadamente diferenciado
19	Conchectomia	Está bem	Macho	SRD	Branco e preta	145,12	Pina	Bem diferenciado
20	Eletroquimioterapia	Está bem	Macho	Angorá	Amarela	15,19	Plano nasal	Moderadamente diferenciado

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE FOSFOPROTEÍNAS SELECIONADAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO mTOR NA ÁREA DE TRANSIÇÃO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÃES

RESUMO

A etiologia do carcinoma de células escamosas (CCEs) apresenta de forma multifatorial e pode estar relacionada a predisposição genética, aos fatores físicos e químicos, principalmente a exposição a radiação ultra violeta. Pacientes caninos que apresentam uma despigmentação ou possuem pelagem clara estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de CCE. Com o aumento da expectativa de vida destes animais, percebe-se o aumento e a frequência do surgimento do CCEs, no entanto, poucos estudos investigaram a desregulação de diferentes proteínas nesses tumores. Desta maneira, o objetivo desse estudo foi investigar a alteração da expressão de S6K1 (proteína ribossômica S6-quinase-1) e p-4E-BP1 (proteína 1 de ligação a 4E fosforilada) em amostras de CCEs na região de transição da pele normal, ceratose actínica e carcinoma. Foram analisados 20 casos de biópsia de cães em que as amostras continham presença de epiderme normal, ceratose e carcinoma, ademais dados clínicos como raça, sexo, idade, coloração da pelagem, localização das lesões e tratamento realizado foram consideradas. Para a avaliação histológica as amostras foram submetidas a coloração de hematoxilina e eosina. Para a análise de imuno-histoquímica foram realizadas utilizados os anticorpo S6K1(Abcam) e p-4E-BP1 (Cell signalig rabbit) da via mTOR para avaliação da transição morfológica. A idade média dos cães analisados foi de 7,21 anos $\pm$ 3,96. Para a coloração da pelagem foram observadas a predominância da pelagem branca (5/20) e branca e preta (7/20). A região abdominal foi o local de a maior ocorrência, e os animais sem raça definida foram mais acometidos. O marcador S6K1 não diferiu estatisticamente para as regiões de transição normal, ceratose actínica e CCEs. Ao considerar os escores, o marcador S6K1 prevaleceu em relação ao marcador p-4E-BP1, embora não haja diferença estatísticasignificativa. Conclui-se que, a expressão dessas proteínas na via pode ser um potencial alvo de estudo no

desenvolvimento terapêutico dos cães pois apresenta-se ativa na via de sinalização PI3K/Akt/mTOR na ceratose actínica e no carcinoma.

Palavras chave: ceratose de actínica, S6K1 e p-4E-BP1, expressão da proteína

ABSTRACT

The etiology of squamous cell carcinoma (SCC) is multifactorial and may be related to genetic predisposition, physical and chemical factors, especially exposure to ultraviolet radiation. Canine patients with depigmentation or light-colored fur are more susceptible to developing SCC. With the increase in life expectancy of these animals, the increase and frequency of SCC emergence is observed; however, few studies have investigated the deregulation of different proteins in these tumors. Thus, the aim of the study was to investigate the alteration in the expression of S6K1 (ribosomal protein S6-kinase-1) and p-4E-BP1 (phosphorylated 4E-binding protein 1) in SCC samples in the transition region of normal skin, actinic keratosis and carcinoma. Twenty cases of biopsy of dogs were analyzed, in which the samples contained the presence of normal epidermis, keratosis and carcinoma. In addition, clinical data such as breed, sex, age, coat color, location of lesions and treatment performed were considered. For histological evaluation, the samples were subjected to hematoxylin and eosin (HE) staining. Immunohistochemistry analysis was performed using the S6K1 antibody (Abcam) and p-4E-BP1 (Cell Signaling rabbit) of the mTOR pathway to evaluate the morphological transition. The average age of the dogs analyzed was 7.21 years $\pm$ 3.96. For coat color, a predominance of white (5/20), white and black (7/20) coats were observed. The abdominal region was the site where the highest occurrence of lesions was observed, and animals of mixed breed (SRD) were the most affected breeds. The S6K1 marker did not differ statistically for the normal transition regions, actinic keratosis and SCCs. When taking into account the scores, the S6K1 marker prevailed in relation to the p-4E-BP1 marker, even though there was no statistically significant difference. It is concluded that the expression of these proteins in the pathway may be a potential target for study in the therapeutic development of dogs, since it is active in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in actinic keratosis and carcinoma.

Key words: actinic keratosis, S6K1 and p-4E-BP1, protein expression

INTRODUÇÃO

Estudos recentes relatam cada vez mais a ocorrência de diversas doenças relacionadas aos cães, sendo impactadas pelo aumento da expectativa de vida. O carcinoma de células escamosas (CCEs) é um tumor maligno cutâneo, com crescimento lento, comportamento localmente invasivo e propensos a recidiva, que está relacionado às baixas taxas de metástase e com alto poder de invasão tecidual, possui uma etiologia que esta ligada a diversos fatores com predisposição genética, exposição aos fatores físicos e químicos tais como a exposição solar (luz ultra violeta), infecção pelo papiloma vírus, alteração na expressão de proteínas, diferença genômica e mutações de genes (ALVES et al., 2022; SOBRINHO et al., 2022).

Uma das maneiras eficientes e disponíveis pode ser por meio da utilização de um diagnóstico rápido e eficaz, isto é, implica diretamente no início do tratamento do paciente. Dentre as alternativas como a citologia, histopatologia e imuno-histoquímica, esta última tem como características, ser uma técnica que consegue detectar proteínas em amostras fixadas em formalina e embebidas por parafinas, a qual combina reações imunológicas e químicas, e permite o reconhecimento de antígenos, o que podem ser utilizados como prognóstico em tumores (RAMOS-VARA; MILLER, 2014; SANZ RESSEL et al., 2023).

Ao considerar as mais diversas doenças como os tumores em cães, é de extrema importância relacionar as vias de expressão ligadas a doença, como por exemplo a via de sinalização PI3K/Akt/Mtor (SANZ RESSEL et al., 2019).

Esta via de sinalização na epiderme canina normal apresenta baixa expressão, na análise do processo de carcinogênese epidérmica a molécula dessa via de sinalização apresenta-se desregulada, ou seja, pode ser um indicativo para o desenvolvimento do câncer, uma vez que a proteína alvo da rapamicina em mamíferos mTOR é responsável pelo crescimento celular (SANZ RESSEL et al., 2019).

A via de sinalização PI3K/Akt/mTOR é um regulador chave das funções celulares, uma vez que a superexpressão de algumas moléculas sinalizadoras pode facilitar a progressão do CCEs canino por meio da desregulação das

principais funções celulares, isto é, podem facilitar a progressão de papilomas cutâneos e carcinomas de células escamosas (SANZ RESSEL et al., 2019).

Dentre os diversos marcadores relacionados a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, a proteína S6K1 é reguladora central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese. Em contrapartida, o S6K1 quando é fosforilado (p-S6K1), torna a forma ativa da proteína S6K1 e está relacionado a um prognóstico ruim e à resistência à terapia endócrina humana (KIM et al., 2017). A fosforilação de 4EBP1 por mTORC1 promove a dissociação de 4EBP1 de EIF4E, permitindo que EIF4E induza tradução de proteínas. Consequentemente, 4EBP1 fosforilado (p-4E-BP1) é aceito como um marcador de sinalização da via mTOR (KARLSSON et al., 2013). A importância de se testar esta via de sinalização PI3K/Akt/mTOR como um futuro potencial alvo terapêutico (SANZ RESSEL et al., 2019).

Diante deste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o padrão de expressão dos marcadores S6K1, p-4E-BP1 da via mTOR na transição morfológica do epitélio normal, ceratose actínica e do CCEs em amostras de CCEs cutâneo de cães, para ajudar a elucidar se a via de transição apresenta relação entre os marcadores e a doença.

MATERIAL E MÉTODO

Design do estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, não randomizado que incluiu amostras de cães previamente diagnosticado com carcinoma de células escamosas (CCEs), que apresentava na mesma amostra a área de transição entre epiderme normal, ceratose actínica e CCEs. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista – Unesp-Botucatu sendo o protocolo CEUA 1005/2024.

Critérios de inclusão e exclusão

Foram analisados 20 casos de biópsia de cães diagnosticadas com carcinoma de células escamosas, do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária da Unesp – Botucatu do período de 01/01/2008 até 31/07/2024. As

amostras incluídas no estudo apresentavam como critério que na mesma amostra a presença epiderme normal, ceratose e carcinoma, e os dados clínicos dos animais incluindo: raça, sexo, idade, coloração da pelagem, localização das lesões, e tratamento realizado. Foram excluídas as amostras nos quais o bloco de parafina não apresentava quantidade suficiente de tecido para análise de imuno-histoquímica ou que não apresentava na mesma amostra transição (normal, ceratose e CCEs).

Avaliação histológica

Mesmo com diagnóstico prévio, as amostras foram novamente analisadas através da coloração de hematoxilina e eosina (HE), para verificar se na mesma amostra apresentava epiderme normal, ceratose actínica e CCEs. A classificação histomorfológica do CCEs foi realizada de acordo com os critérios de Müller e Kirk's (2012), e foram classificados em CCEs bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados.

Avaliação imuno-histoquímica

Para a análise de imuno-histoquímica foram utilizados os anticorpos S6K1 (Abcam) e p-4E-BP1 (Cell signalig rabbit) as amostras que apresentava as três transições foram novamente realizadas os cortes histológicos obtidos à espessura de 4 μ m, que foram distendidos sobre lâminas com carga positiva (Starfrost®, Knittel, Braunschweig, Alemanha), secos à temperatura ambiente e, em seguida, mantidos à temperatura de 56°C durante 12 horas. Os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais de xilol, reidratados em banhos sequenciais de etanol e lavados em água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados com reagente comercial específico, pronto para uso, durante 15 minutos (Dako Dual Endogenous Enzyme Block). A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão citrato, pH 6,0, em panela de pressão (Pascal, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), durante 20 minutos e com resfriamento em 20 minutos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada por incubação por 20 minutos, realizado com peróxido de hidrogênio 8% diluídos em álcool metílico. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado com leite desnatado em pó

(caseína). A diluição inicial de cada anticorpo primário foi realizada 1:500 para os anticorpos S6K1 e p-4E-BP1, com incubação overnight. A incubação do anticorpo secundário foi realizada com um kit comercial EnVision FLEX, High pH e posteriormente colocado o cromógeno (3,3'-diaminobenzidina). Todos os cortes foram corados com hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram realizados incubando as amostras com a imunoglobulina do anticorpo primário. O controle positivo foi realizado de acordo com as recomendações do *The Human Protein Atlas*.

Por fim, os cortes foram corados com hematoxilina, por um minuto (HE), e lavados, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula histológica para posterior avaliação à microscopia óptica. Análise das lâminas foi realizada com escore através da avaliação semiquantitativa.

Para avaliação da imuno-histoquímica foi realizada uma análise quantitativa, sendo que o número de células epidérmicas positivas foi expresso em escala de pontuação: no qual 0 apresentava menos de 10% de células coradas; 1 entre 10-25%; 2 entre 25-50%; 3 entre 50-75% de 4 entre 75 -100% de células coradas (MOLINOLLO et al., 2016).

Análise estatística

As análises estatísticas realizadas neste estudo foram apropriadas para dados não paramétricos, uma vez que os resultados são expressos em escores obtidos a partir da leitura das lâminas. As comparações dentro de cada marcação imuno-histoquímica (S6K1 e p-4E-BP1) entre as subclassificações (pouco, moderadamente e bem diferenciados; normal, ceratose e carcinoma) foram conduzidas utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido do ajuste de Dunn para comparações múltiplas.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações entre dois grupos. Para comparações entre as marcações imuno-histoquímicas dentro de cada subclassificação, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas com $p < 0,05$, e estão indicadas por letras minúsculas distintas. Os resultados são mostrados como

mediana (Q1 – Q3). Todas as análises estatísticas e a elaboração das figuras foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (versão 9.3.0).

RESULTADOS

Dados clínicos

Para a análise das informações clínicas foram consideradas, para este estudo os dados clínicos dos animais como: raça, sexo, idade, coloração da pelagem, localização das lesões, tratamento realizado conforme descrito na Tabela 1 no final do artigo.

Ao analisar os dados amostrais na Figura 1, a respeito do sexo dos cães, 35% de pacientes machos e 65% fêmeas. A idade média dos cães analisados foi de 7,21 anos $\pm$ 3,96. Para a coloração da pelagem constatada dos pacientes foram: branca (5/20), branca e preta (7/20), marrom (1/20), branco e marrom (4/20), preto (1/20), branco preto e marrom (1/20) e preto e marrom (1/20).

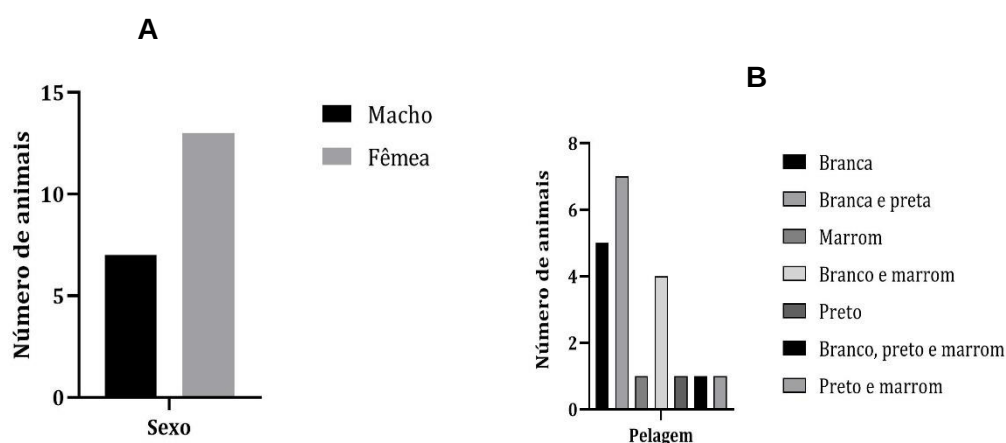


FIGURA 1. A. Relação entre os cães e o sexo B. Relação entre a quantidade de cães e característica da pelagem.

A localização das lesões, mostradas na Figura 2, foi demonstrada principalmente na região abdominal (9/20), lombar (1/20), membro (1/20), pálpebra (1/20), peniana (6/20), tórax e abdominal (1/20) e tórax (1/20). Sendo as raças mais acometidas de cães: sem raça definida (11/20), pit bull (6/20), pequinês (1/20), fox paulistinha (1/20) e dalmata (1/20).

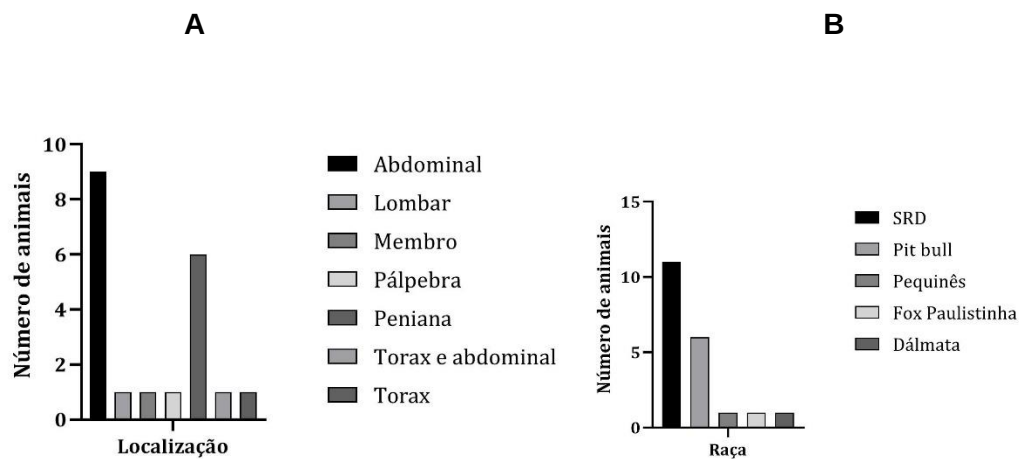


FIGURA 2. A. relação entre cães e a localização das lesões. B. Principais raças de cães apresentados.

Casos de cães que apresentavam carcinoma pouco diferenciado em (2/20), moderadamente diferenciado (6/20) e muito diferenciado (12/20).

Ao analisar a marcação imuno-histoquímica (S6K1 e p-4E-BP1) Figura 3, nas amostras de área de transição da doença em cães constatou-se que para o marcador S6K1, não havia diferença estatisticamente significativas entre as classificações e para o marcador p-4E-BP1 apresentou diferença estatística significativa entre o carcinoma e a pele normal.

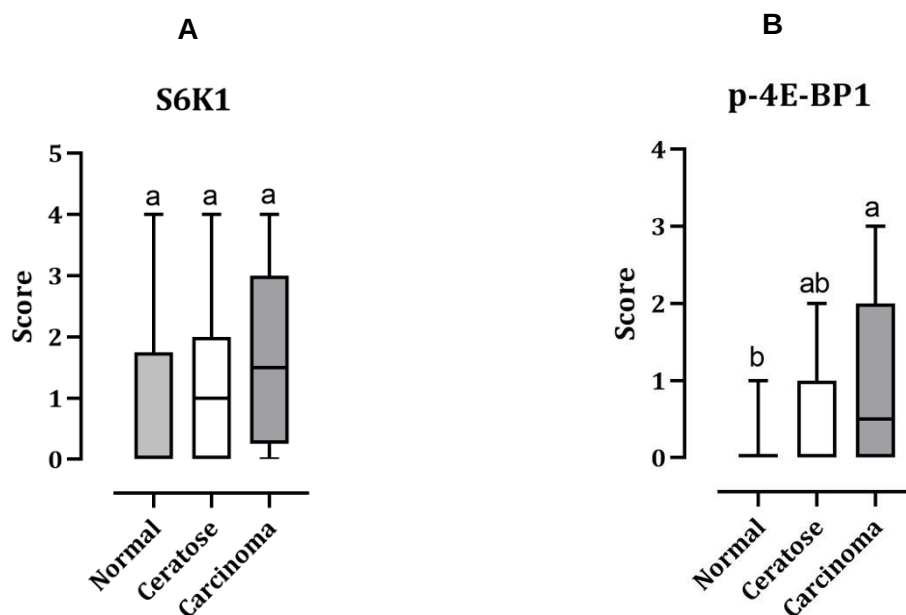


FIGURA 3. A. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores S6K1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma B. Marcação imuno-histoquímica para os marcadores p-4E-BP1 na região de transição normal, ceratose e carcinoma. Letras minúsculas comparam as classificações (normal ceratose e carcinoma) segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Ao considerar o escore para o marcador S6K1 o carcinoma apresentou o maior score quando comparado a ceratose e ao normal. Já para o score do marcador p-4E-BP1 para o carcinoma, houve variação de 1 a 2.

A análise dos marcadores S6K1 e p-4E-BP1, (Figura 4), em relação a classificação ao carcinoma houve diferença estatisticamente significativa, para a classificação carcinoma pouco diferenciado, não houve diferença estatística significativa para as classificações carcinoma moderadamente diferenciado e para o carcinoma bem diferenciado.

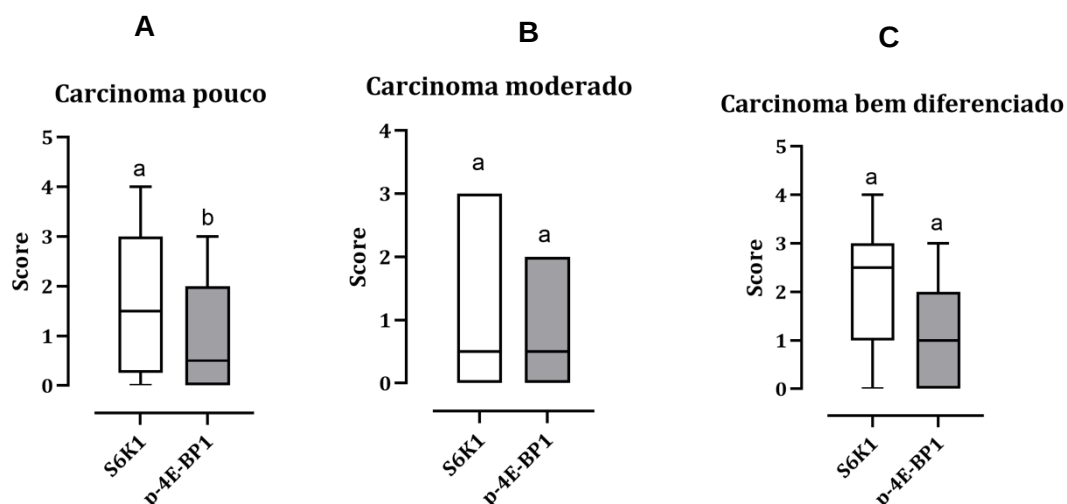


FIGURA 4. A. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma pouco diferenciado. B. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma moderadamente diferenciado. C. Classificação quanto os marcadores S6K1 e p-4E-BP1 referente a classificação do carcinoma bem diferenciado. Letras minúsculas comparam os marcadores segundo o teste de Mann-Whitney com $p < 0,05$.

Na Figura 5, foram apresentados a região de área de transição, conforme a relação do score para o marcador S6K1.

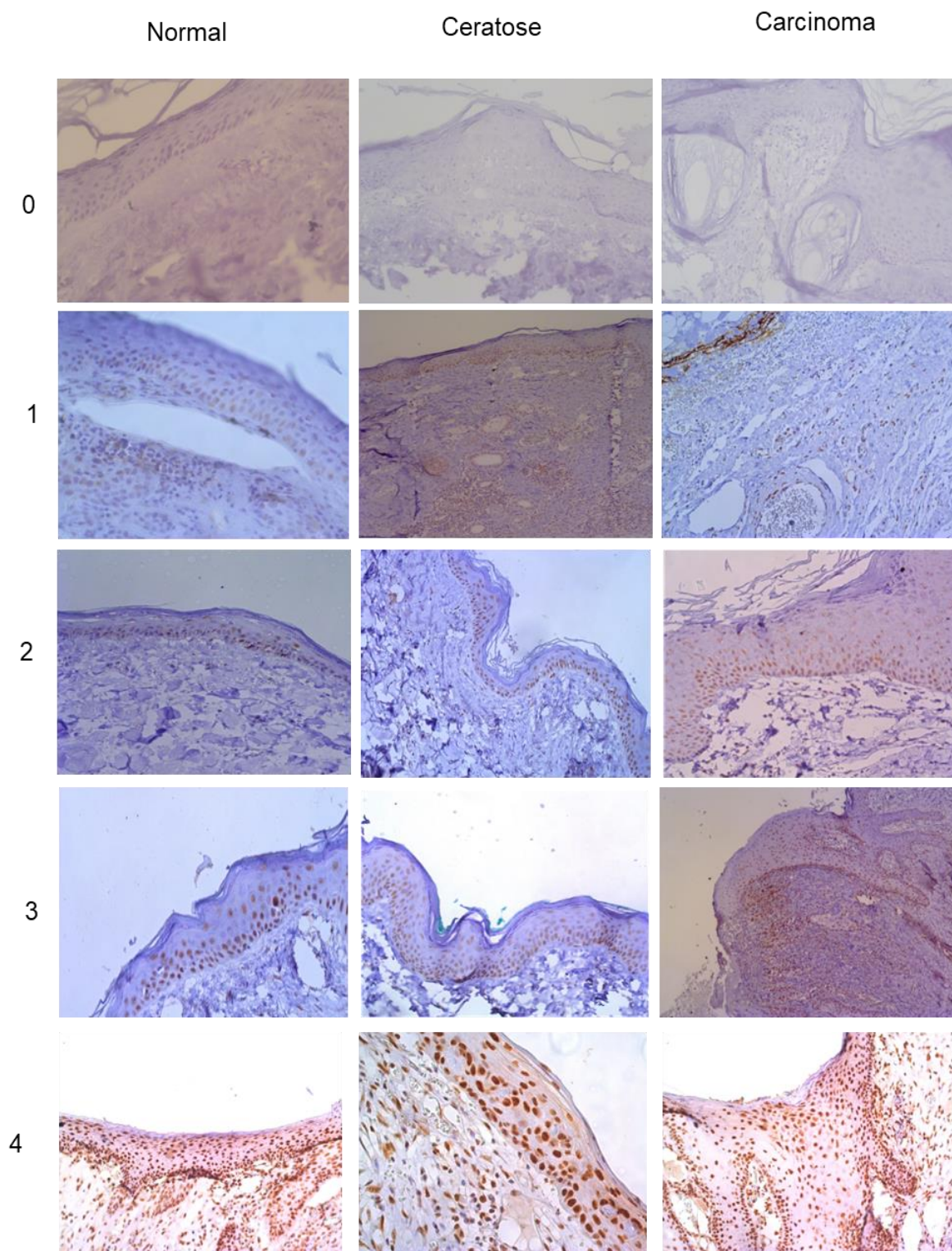


FIGURA 5. Análise quantitativa através do escore conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador S6K1. Fonte: arquivo pessoal (2024).

Na Figura 6, foram apresentados a região de área de transição conforme a relação do score para o marcador p-4E-BP1. Para o escore 3 e 4 na pele normal não foram constatadas marcações.

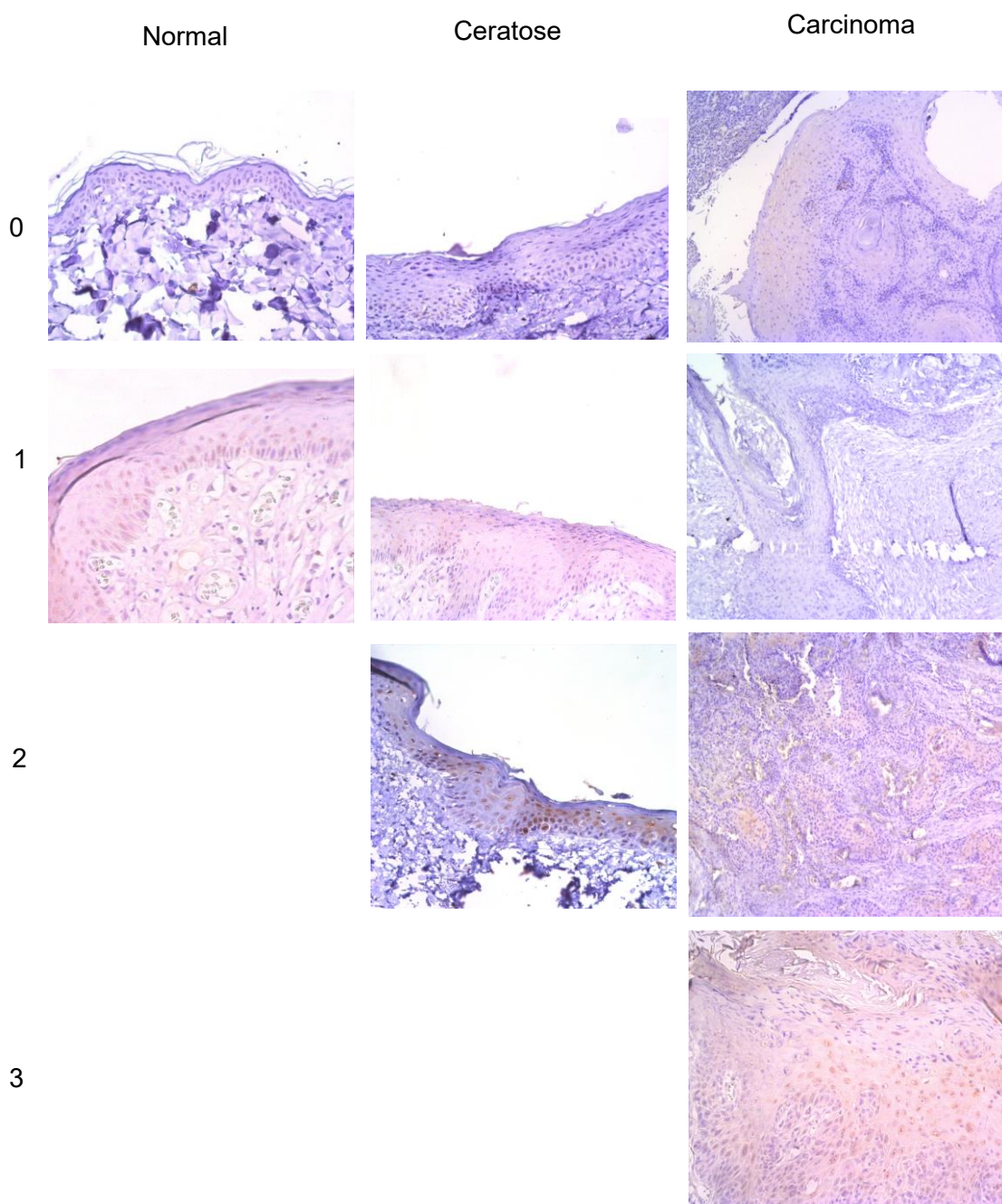


FIGURA 6. Análise quantitativa através do escore conforme a classificação da área de transição em região pele normal, ceratose e carcinoma (10x e 40x) para o marcador p-4E-BP1. Análise do escore dois normal e três normal e ceratose não apresentou amostra para análise. Fonte: arquivo pessoal (2024).

DISCUSSÃO

A avaliação de dados clínicos dos pacientes caninos tais como idade, sexo, coloração da pelagem, localização das lesões, raça, são informações que podem ser indicativas e estarem relacionadas aos tipos de doenças de pele, isto é, os dados clínicos com a análise de novos marcadores podem auxiliar na avaliação da região de transição de pele normal, ceratose e CCEs por meio de marcadores da via mTOR em cães.

Ao considerar o sexo dos cães no presente estudo não foi constatado diferença estatisticamente significativa com a relação ao marcador da via mTOR. Fato este corroborado por Sanz Ressel et al., 2019; Magalhães et al., 2024 ao estudarem CCEs em cães, também não identificaram a relação dos dados clínicos com a via de expressão imuno-histoquímica.

Para o tipo de pelagem, dos cães analisados não foram constatadas diferença estatisticamente significativas, no entanto, a coloração da pelagem pode ser um indicativo da predisposição ao surgimento da doença, levando em consideração o fator multifatorial da doença. De acordo com Brollo et al (2014) e Goldschmidt e Goldschmidt (2017) dados clínicos como idade e áreas despigmentadas dos animais, e pelagem rarefeitos são fatores que predispõem ao desenvolvimento de CCEs.

Quanto a localização da lesão apresentada nos cães desse estudo, não foi constatado diferença estatisticamente significativa para os marcadores analisados. O mesmo fato foi observado nos estudos de Goldschmidt e Goldschmidt (2017) e Sanz Ressel et al (2019), ao que avaliarem os dados clínicos não constatarem a relação com os locais que apresentaram lesões.

Ao analisar as raças de cães, não foi constatado diferença estatisticamente significativa com os marcadores da via mTOR, apesar dos resultados apresentarem uma prevalência para os cães sem raça definida. Já nos estudos de Gross et al (2009) os cães das raças dálmata, pit bull, dogue alemão, boxer e poodle se destacam com a manifestação do carcinoma.

Dentre as diversas técnicas para diagnóstico e prognóstico, a utilização por meio da expressão da proteína pela avaliação da imuno-histoquímica, é uma técnica a qual possibilita a determinação da superexpressão de moléculas sinalizadoras e anticorpos fosfoespecíficos da via fosfatidilinositol 3-

quinase/Akt/alvo da rapamicina em mamíferos (PI3K/Akt/mTOR) que está frequentemente ativada em CCEs em cães (SANZ RESSEL et al., 2019; SANZ RESSEL et al., 2021; SANZ RESSEL et al., 2023).

O marcador p-4E-BP1 é considerado um marcador de sinalização da via mTOR ativada, com níveis elevados em alguns tumores, no qual é relatado algumas mutações em cães como no carcinoma mamário, no carcinoma de tireoide, no hemangiossarcoma e também no CCEs.

Ao analisar o marcador p-4E-BP1, relacionado com a progressão do CCEs, este marcador apresentou diferença estatisticamente significativa para a transição normal e carcinoma, isto é, pode ser um marcador potencial alvo da via PI3K/Akt/mTOR. Outros trabalhos com a utilização deste marcador foram relatados em casos de tumor prostático, hemangiossarcoma e carcinoma mamário (MURAI et al., 2012; CALDERON et al., 2019; MEUTEN et al., 2024).

Assim como Sanz Ressel et al. (2021), em seu estudo avaliaram a expressão de duas proteínas chave da sinalização PI3K/Akt/mTOR, no qual avaliou-se tanto na epiderme normal, ceratose e carcinoma ajudando a elucidar os mecanismos desregulados durante o processo da carcinogênese epidérmica, ressaltando fornecer informações importantes sobre potenciais alvos mais adequados referente ao desenvolvimento de novas terapias.

O marcador S6K1, atua como um regulador central da sobrevivência e proliferação celular, metabolismo, migração e angiogênese, sendo utilizado como um marcador preditivo e prognóstico (KIM et al., 2017).

Ao considerar os marcadores S6K1 e p-4E-BP1, relacionando-os com a progressão do CCEs, embora o marcador S6K1 não apresentasse diferenças estatísticas significativas, ao considerar o seu escore nas lâminas, este marcador tem um potencial de desempenho para a marcação da imuno-histoquímica para o carcinoma. De acordo com Sanz Ressel et al (2019) ao utilizar a imuno detecção da forma fosforilada de Akt e pS6Ser235/236 mostrou-se persistente ativada em lesões caninas, apresentando hiper-reatividade no CCEs. Este marcador apresentou um potencial para o uso como biomarcador prognóstico em carcinoma espinocelular oral canino (DELGADO et al., 2022).

CONCLUSÃO

Na via PI3K/Akt/mTOR utilizando marcadores S6K1, p-4E-BP1 notou-se que o marcador S6K1 apresentou um padrão de expressão da proteína de sinalização.

A avaliação da transição morfológica do epitélio normal, ceratose e CCEs, através da expressão imuno-histoquímica de duas proteínas (S6K1, P-4E-BP1) da via mTOR, permite uma nova opção terapêutico para os cães.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.S.; CAVALCA, A.M.B.; ALVES, C.E.F. A Critical Review of the risk factors associated with Canine Squamous Cell Carcinoma development. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2022. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v15i1p1-10.

DELGADO, L.; MONTEIRO, L.; SILVA, P.; BOUSBAA, H.; GARCEZ, F.; SILVA, J.; BRILHANTE-SIM.ES, P.; PIRES, I.; PRADA, J. BUBR1. Prognostic Biomarker in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. **Animals**, v. 12, p. 3082, 2022. DOI: 10.1177/03009858231207021.

GOLDSCHMIDT, M.H; GOLDSCHMIDT, K.H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. IN: MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 5th edition, p. 88 – 141, 2017.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.O.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Doenças de pele do cão e do gato: 347 diagnóstico clínico e histopatológico**, 2th Edit, Ed, Roca, São Paulo, p. 837-842, 2009.

KARLSSON E.; TENORIO, G.P.; AMIN, R.; BOSTNER J.; SKOOG, L.; FORNANDER, T.; SGROI, D.C.; NORDENSSKJOLD B.; HALLBECK, A.L.; STAL, O. The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomized Stockholm tamoxifen trials. **Breast cancer research**, v.15, n.5, 2013. DOI: 10.1186/bcr3557.

KIM, H.A.; KIM, J.H.; CHOI, H.S.; KIM, Y.G.; LEE, S.J.; HAN, K.H.; SEONG, M.K.; SEOL, H.S.; NOH, W.C. Core needle biopsy specimens are more appropriate than surgical specimens for evaluating the expression of phosphoproteins as biological markers in invasive breast cancer. **Anticancer Research**, v.37, n.3, p.1409-1412, 2017. DOI: 10.21873/anticancer.11463.

MAGALHÃES, P.L.; NASCENTE, E.P.; FALEIRO, ALMEIDA, A.M.S.; FONSECA-ALVES, C.E.; MOURA, V.M.B.D. Immunostaining and gene expression of epidermal growth factor receptors (HER1/HER2) in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **Research in Veterinary Science**, 177 105363, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105363>

MEUTEN, T. K.; DEAN, G.A.; THAMM, D.H. Review: The PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathway in canine cancer. **Vet Pathol**, v. may 61, n.3, p. 339-356, 2024. DOI: 10.1177/03009858231207021

MOLINOLO, A.A., HEWITT, S.M., AMORNPHIMOLTHAM, P., KEELAWAT, S., RANGDAENG, S., MENESES GARCIA, A., RAIMONDI, A.R., JUFE, R., ITOIZ, M., GAO, Y.; SARANATH, D.; KALEEBI, G.S.; YOO, G.H, LEAK, L.; MYERS, E.M.; , SHINTANI, S.; WONG, D.; MASSEY, D.; YEUDALL, A.; LONARDO, F.; ENSLEY, J.; GTKIND, J.S. Dissecting the Akt/mammalian target of

rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. **Clin. Cancer Res**, v. 13, p.4964–4973, 2007.

MURAI, A.; ASA, A.S.; KODAMA A.; HIRATA, A; YANAI, T; SAKAI, H. Constitutive phosphorylation of the mTORC2/Akt/4E-BP1 pathway in newly derived canine hemangiosarcoma cell lines. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 128, 2012. DOI: 10.1186/1746-6148-8-128

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry – the red, brown, and blue technique. **Veterinary Pathology**, v.51, n.1, p.42-87, 2014. DOI: 10.1186/1746-6148-8-128

RIVERA-CALDERÓN LG, FONSECA-ALVES CE, KOBAYASHI PE, ET AL. P-mTOR, p-4EBP-1 and eIF4E expression in canine prostatic carcinoma. **Res Vet Sci**, v.122, p. 86–92, 2019. 10.1016/j.rvsc.2018.11.006

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signaling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **The Veterinary Journal**, v. 245, p. 41-48, 2019. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.12.024

SANZ RESSEL, B.L.; MASSONE, A.R.; BARBEITO, C.G. Persistent activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in cutaneous squamous cell carcinomas in cats. **Veterinary Dermatology**, v.32, n.6, p. 675-e180, 2021. DOI: 10.1111/vde.13001.

SANZ RESSEL, B.L.; MOLINOLO, A.A. Immunohistochemical Techniques for Phosphoproteins. **Signal Transduction Immunohistochemistry**, v. 2593, p. 259-264, 2023. DOI:https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2811-9_17.

SOBRINHO, A.V.A.; ALVES-RIBEIRO, B.S.; MORAES, I.S.; RAMOS, D.G.S.; SATURNINO, K.C. Diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em cão – relato de caso. **I Congresso Nacional de Especialidade Veterinárias**, 2022. DOI: 10.51161/convesp/7325.

TABELA 1. Informações clínicas dos pacientes caninos avaliados no estudo: idade, sexo, raça, coloração da pelagem, localização da lesão, e classificação morfológica.

	Tratamento	Causa do óbito	Sexo	Raça	Coloração pelagem	Idade meses	Localização	Classificação
1	Nodulesctomia, crioterapia	DRC	Macho	SRD	Branco e preto	120,92	Tórax e abdominal	Bem diferenciado
2	Nodulesctomia	Está bem	Macho	Pequinês	Preto	26,73	Tórax	Bem diferenciado
3	Nodulesctomia	Doença	Fêmea	SRD	Branco e marrom	84,82	Abdominal	Moderadamente diferenciado
4	Nodulesctomia, crioterapia	Doença	Fêmea	Pit bull	Branco	30,9	Abdominal	Bem diferenciado
5	Nodulesctomia	Doença	Fêmea	Fox Paulistinha	Branco preto e marrom	93,63	Abdominal	Bem diferenciado
6	Nodulesctomia	DRC	Fêmea	SRD	Branco e preto	60,59	Abdominal	Moderadamente diferenciado
7	Nodulesctomia	Doença	Macho	Pit bull	Branco e marrom	145,68	Peniana	Bem diferenciado
8	Nodulesctomia	Doença	Fêmea	SRD	Branco e marrom	45,63	Abdominal	Pouco diferenciado
9	Nodulesctomia	Doença	Macho	SRD	Branco e preto	72,72	Abdominal	Pouco diferenciado
10	Nodulesctomia, enucleação	Está bem	Fêmea	SRD	Branco e preto	132,82	Pálpebra	Bem diferenciado
11	Penectomia	Doença	Macho	SRD	Branco e marrom	150,25	Peniana	Moderadamente diferenciado
12	Penectomia	Doença	Fêmea	Pit bull	Branco	60,69	Peniana	Moderadamente diferenciado
13	Nodulesctomia	Doença	Fêmea	Pit bull	Marrom	50,1	Abdominal	Moderadamente diferenciado
14	Nodulesctomia	Está bem	Fêmea	SRD	Preto e marrom	108,07	Lombar	Bem diferenciado
15	Nodulesctomia	Está bem	Fêmea	SRD	Branco e preto	60,43	Abdominal	Moderadamente diferenciado
16	Nodulesctomia, penectomia	Está bem	Fêmea	Pit bull	Branco	109,08	Peniana	Bem diferenciado
17	Penectomia	Doença	Macho	SRD	Branco	192,95	Peniana	Bem diferenciado
18	Nodulesctomia e eletorquímio	Está bem	Fêmea	Dálmata	Branco e preto	123,09	Membro	Bem diferenciado
19	Nodulesctomia	Está bem	Fêmea	SRD	Branco	36,99	Abdominal	Bem diferenciado
20	Penectomia	Está bem	Macho	Pit bull	Branco e preto	24	Peniana	Bem diferenciado

Discussão geral

O carcinoma de células escamosas (CCEs) surge a partir dos queratinócitos cutâneos, sendo uma neoplasia cutâneo maligna que pode acometer cães e gatos apresentando um alto poder de invasão tecidual. Suas características clínicas nessas espécies apresentam de diversos aspectos variando desde o desenvolvimento de lesões em regiões glabras ou com pigmentação leve.

O presente estudo teve por objetivo avaliar retrospectivamente casos CCEs e caracterizar a transição morfológica e molecular do epitélio normal para ceratose e carcinoma em cães e gatos. A presente tese foi dividida em três capítulos, que abordam diferentes aspectos do carcinoma de células escamosas em cães e gatos.

O capítulo 1 é um estudo retrospectivo não randomizado de 304 casos de ceratose actínica e carcinoma espinocelular em cães e gatos da UNESP – Botucatu-SP: 2008 – 2024, referente ao banco de dados do setor e Patologia da Unesp de Botucatu e que observou um período de 16 anos. Demonstrado a proporção dos casos atendidos pelo setor e entender o perfil desses pacientes quanto aos dados levantados como raça, sexo, idade e coloração da pelagem, localização das lesões, tempo de sobrevida, procedimento realizado em relação ao tratamento. No que implica alguns dados apresentava dados incompletos por se tratar de um banco de dados de laboratório algumas informações perante ao histórico do paciente ficava deficiente principalmente em relação a sobrevida do paciente. No caso foi realizado o contato com todos os tutores para o levantamento referente aos dados. O perfil dos pacientes levantados do estudo retrospectivo de ambas as espécies apresentam características de pelagem clara e idosos o que impacta na predisposição dos pacientes.

Tanto no capítulo 2 e 3 foi realizado a caracterização na mesma amostra através da utilização de marcadores da via PI3K/Akt/mTOR na transição morfológica e molecular do epitélio normal para ceratose e carcinoma o que diferenciando a comparação foi a separação das espécies.

O capítulo 2 as avaliações da expressão imuno-histoquímica de fosfoproteínas da via de sinalização mTOR em carcinoma espinocelular de felinos por ser tratar de uma avaliação foi analisado na mesma amostra a área normal, ceratose e carcinoma na mesma amostra sendo analisado previamente as amostras para selecionar o que seria realizado a imuno-histoquímica. Algumas amostras durante a seleção para realização não apresentava todas as áreas na mesma amostra.

O capítulo 3 avaliações da expressão imuno-histoquímica de fosfoproteínas selecionadas da via de sinalização mTOR na área de transição de carcinoma espinocelular em cães.

A avaliação da transição morfológica do epitélio normal, ceratose e CCEs, ocorreu concomitante à alteração das proteínas da via mTOR (S6K1, p-4E-BP1) demonstrando que na progressão maligna da doença, essa via pode ter papel chave no desenvolvimento do tumor.

CONCLUSÃO GERAL

A importância do estudo do CCEs em cães e gatos refleti pelo aumento de casos nessas espécies. A compreensão do perfil atual dos pacientes é necessário através de estudos retrospectivos, para conhecer o padrão de manifestação como localização, idade, raça, sobrevida destes pacientes e qual classificação dos tipos de carcinoma. Como notamos que na abordagem desse estudo retrospectivo dos casos de ceratose actínica e CCEs no período 2008 – 2024 contabilizando 304 casos de animais o que observou uma prevalência de animais de pelagem clara com uma idade média de paciente idoso.

O estudo da ativação do padrão de expressão da proteína de sinalização da via PI3K/Akt/mTOR para a ceratose actínica e para o carcinoma, se torna uma opção que pode impactar em possíveis alternativas terapêuticas e também quanto ao fator prognóstico da doença.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ATESTADO

Atesto que o Projeto: Expressão de proteínas da via de sinalização do mTOR em ceratose actínica e carcinoma espinocelular cutâneo em cães e gatos , Protocolo CEUA 1005, a ser conduzido por Alana Lucena Oliveira , responsável/orientador Carlos Eduardo Fonseca Alves, para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade: Pesquisa Científica

Vigência do Projeto: 12/02/2024 a 31/07/2024

Projeto de pesquisa aprovado em reunião da CEUA em: 09/02/2024

Juliany Gomes Quitzan
Presidente da CEUA
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Botucatu

UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica

Emitido em: 18/02/2024 17:52