

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DA E-CADERINA E DO FATOR DE CRESCIMENTO
DO ENDOTÉLIO VASCULAR NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS E NO TUMOR DE CÉLULAS BASAIS DE CÃES**

Carolina Franchi João

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EXPRESSÃO DA E-CADERINA E DO FATOR DE CRESCIMENTO
DO ENDOTÉLIO VASCULAR NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS E NO TUMOR DE CÉLULAS BASAIS DE CÃES**

Carolina Franchi João

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirela Tinucci Costa

**Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre em Medicina
Veterinária (Clínica Médica).**

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

J62e João, Carolina Franchi
Expressão da E-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães / Carolina Franchi João. – – Jaboticabal, 2008
xvii, 42 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Mirela Tinucci Costa
Banca examinadora: Luiz Carlos Fazuoli, Miguel Ângelo Mutton
Bibliografia

1. carcinoma de células escamosas. 2. tumor de células basais. 3. E-caderina. 4. VEGF. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CAROLINA FRANCHI JOÃO – nascida em 28 de janeiro de 1981, em Guaranésia, Minas Gerais. É Médica Veterinária formada pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, campus de Jaboticabal em dezembro de 2003. Durante a graduação fez Iniciação Científica, no Departamento de Patologia Veterinária, sob orientação do Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó, com o projeto “Comparação das cepas de *Rhipicephalus sanguineus* do Brasil e da Argentina”. Em 1º de fevereiro de 2004 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Jaboticabal, o que concluiu em 31 de janeiro de 2006, sob orientação da Profª. Drª. Mirela Tinucci Costa. Em 1º de março de 2006, após concurso de seleção, iniciou o programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica, curso de Mestrado, junto a FCAV, UNESP, campus de Jaboticabal, sob a orientação da Profª. Drª. Mirela Tinucci Costa.

**“Os ventos e as ondas são sempre favoráveis
aos marinheiros hábeis.”**

DEDICO...

... ao meu pai **Jorge** e a minha mãe **Maria Regina**, por tudo que fizeram por mim até hoje, por sempre acreditarem em mim, também são responsáveis por essa conquista!!!

... aos meus irmãos **Marina** e **Jorge Filho** por serem meus melhores amigos em todos os momentos!!!!

... ao meu namorado **Diogo** por sempre estar ao meu lado, me ajudando e incentivando em todos os momentos!!!!
(por ter me ensinado a escrever nos gráficos e tentar fazer o abstract!!rsrs)

Amo todos vocês!!!!

OFEREÇO...

...ao meu querido **avô Ítalo**,
que foi um grande exemplo de força e perseverança na minha vida...

AGRADEÇO...

...à Deus, por permitir tudo isso,

...à minha vó Delfina por todo amor,

...à Zanza, Lela, tia Rita, tio Pedro, tio Fernando, tia Isa por todo incentivo,

...a todos tios, tias e primos pelo apoio,

...ao Seu Tutu e D. Marilza por sempre me acolherem tão bem,

...à professora Mirela, por além de ser uma orientadora sempre presente, é uma amiga para todos os momentos. E por ter me mostrado esse mundo incrível e intrigante da imunopatologia,

...aos professores Rose e Alessi da Unesp de Jaboticabal, Reneé, da Unesp de Botucatu e Gisele da Unesp de Araçatuba, por toda contribuição na realização deste trabalho,

...aos professores Danízio e Barboza pela imensa contribuição na estatística,

...às funcionárias Lia da Patologia e Marilde do nosso laboratório de Imunoistoquímica por sempre estarem dispostas a ajudar, foram imprescindíveis neste trabalho,

...à residente Geórgia da Patologia por toda paciência e dedicação em me ajudar a “relembrar” a histopatologia,

...à Fapesp e a Capes pelo auxílio financeiro e bolsa concedidos,

...aos meus amigos Joice e Wanderson por estarem sempre presentes, dispostos a ajudar em todos os momentos, além de serem ótimos companheiros,

...aos meus amigos Valeska, Puff e Patrícia por todo companheirismo e por nossas divertidas caminhadas,

...a todos os amigos do Hospital Veterinário, em especial Thiago, Sabrina Costa, Sabrina Calazans, Sofia, Jane, Daniel, Ana Cláudia e Giovane por todo apoio,

...aos meus ex-colegas de residência Tatiana, Alexandre, João Paulo, Thiago e Sabrina por toda aprendizagem,

...à Unesp de Jaboticabal por ter me acolhido desde 1999,

...a todos os cães, em especial a Susi, Liz, Baruc e Dorinha por serem o motivo de tudo isso,

...a todos os colegas da pós-graduação pela boa convivência,

...a todos os professores da FCAV- Jaboticabal pela grande importância na minha formação profissional,

...a todos os funcionários do Hospital Veterinário pelo bom convívio,

...a todos que não foram citados, mas de alguma maneira foram importantes para esse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1- Carcinoma de células escamosas.....	2
2.2- Tumor de células basais.....	3
2.3- Moléculas de adesão.....	5
2.3.1- Caderinas.....	6
2.4- Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF).....	9
3- OBJETIVOS.....	11
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1- Obtenção das amostras.....	12
4.2- Histopatologia.....	12
4.3- Reação de imunoistoquímica.....	14
4.4- Análise estatística.....	16
5- RESULTADOS.....	17
5.1- Diagnóstico histopatológico e dados dos animais.....	17
5.2- Expressão de E-caderina.....	20
5.3- Expressão do VEGF.....	24
5.4- Correlação entre a E-caderina e o VEGF no CCE.....	27

5.5- Correlação entre a E-caderina e o VEGF no TCB.....	28
6- DISCUSSÃO.....	30
7- CONCLUSÃO.....	35
6- REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEQ	Carcinoma de células escamosas queratinizado
CCENQ	Carcinoma de células escamosas não queratinizado
DAB	Diaminobenzidine
E-caderina	Epithelial-caderina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
HE	Hematoxilina-Eosina
LSAB	Sistema de Detecção Ultra Estreptavidina Universal
MAC	Molécula de adesão celular
N- caderina	Neural-caderina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
P-caderina	Placental-caderina
SRD	Sem raça definida
TCB	Tumor de células basais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Fotomicrografia dos tumores caninos empregados neste estudo: (A) Tumor de células basais do tipo medusóide (x200); (B) Tumor de células basais do tipo sólido (x400); (C) Tumor de células basais do tipo adenóide (x200); (D) Carcinoma de células escamosas não queratinizado (x400). (E e F) Carcinoma de células escamosas queratinizado (x200); Coloração pela Hematoxilina & Eosina.....	13
Figura 2- Frequência dos carcinomas de células escamosas, distribuídas conforme a raça e sexo dos cães acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.....	18
Figura 3- Frequência dos tumores de células basais, distribuídas conforme a raça e sexo dos cães acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.....	19
Figura 4- Porcentagem de cães machos e fêmeas com carcinoma com células escamosas e com tumor de células basais. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	19
Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE e de TCB mostrando a expressão normal e reduzida da molécula E-caderina. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	20
Figura 6- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão normal de E-caderina, com mais de 75% de células neoplásicas marcadas com coloração intensa no CCE queratinizado (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	21
Figura 7- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão reduzida de E-caderina, com menos de 75% de células neoplásicas marcadas no TCB do tipo adenóide (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	22
Figura 8- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um CCEQ. Observar a marcação intensa pelo anticorpo anti-E-caderina nas glândulas sebáceas, que serviram como controle positivo no próprio corte. (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	22

Figura 9- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo com diferentes tipos de marcação pelo anticorpo anti E-caderina das células neoplásicas, onde as células mais diferenciadas apresentaram coloração mais intensa.CCEQ (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	23
Figura 10- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE e de TCB mostrando a expressão positiva e negativa do VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	24
Figura 11- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão positiva para o VEGF, com mais de 25% de células neoplásicas marcadas com coloração intensa no CCE queratinizado (x100). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	25
Figura 12- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão negativa para o VEGF no CCE queratinizado (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	25
Figura 13- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um CCEQ. Observar a marcação intensa pelo anticorpo VEGF nas células endoteliais, que serviram como controle positivo no próprio corte. (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	26
Figura 14- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE comparando a expressão normal/positiva e reduzida/negativa das moléculas E-caderina e VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	27
Figura 15- Representação gráfica da porcentagem de amostras de TCB comparando a expressão normal/positiva e reduzida/negativa das moléculas E-caderina e VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.....	29

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Anticorpos primários, diluição e recuperações antigênicas empregadas.....	14
Tabela 2 - Classificação histopatológica dos carcinomas de células escamosas, informando as raças, idades e sexo dos animais acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.....	17
Tabela 3 - Classificação histopatológica dos tumores de células basais, informando as raças, idades e sexo dos animais acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.....	18
Tabela 4 - Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina no CCE e no TCB.....	21
Tabela 5 - Comparação pelo teste de Fisher da expressão do VEGF no CCE e no TCB.....	24
Tabela 6 - Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina e do VEGF no CCE.....	27
Tabela 7 - Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina e do VEGF no TCB.....	28
Tabela 8 - Número e porcentagem de amostras do CCE e do TCB que apresentaram expressão reduzida/negativa e normal/positiva das moléculas E-caderina e VEGF.....	28

Expressão da E-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães

RESUMO - O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna que emerge dos queratinócitos e corresponde a aproximadamente 5% dos tumores cutâneos dos cães. Os tumores de células basais são compostos quase exclusivamente por células basais e apresentam uma incidência de 4 a 12% entre as neoplasias cutâneas caninas. O carcinoma de células escamosas e o tumor de células basais são neoplasias comumente registradas na clínica de pequenos animais. As caderinas compreendem uma classe de moléculas de adesão celular expressas na superfície de todas as camadas epidérmicas. A E-caderina é a principal caderina envolvida na adesão celular epitelial. A redução de sua expressão está envolvida com a progressão de alguns tipos de câncer, principalmente os carcinomas, seu poder metastático, e ainda na definição do prognóstico. Não há muitos estudos na veterinária com relação à expressão dessas moléculas em tumores. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um potente mitógeno para células endoteliais e sua expressão tem sido relacionada com o aumento da angiogênese tumoral. O VEGF além de estimular a angiogênese, produz collagenase e outras enzimas degradativas que facilitam a saída das células neoplásicas para a circulação, além de estimularem o crescimento das células tumorais. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão da E-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em tecidos caninos histologicamente classificados como carcinoma de células escamosas e tumor de células basais, buscando-se uma correlação com o grau histológico desses tumores. A expressão normal e reduzida da E-caderina apresentou diferenças significativas comparando-se o tumor de células basais com o carcinoma de células escamosas quando avaliada pelo teste de Fisher ($P=0,0039$). Também foi observado em algumas amostras que no mesmo campo, existiam células neoplásicas mais diferenciadas com coloração mais intensa que células menos diferenciadas. A expressão positiva e negativa do VEGF também apresentou diferença significativa quando avaliada pelo teste de Fisher ($P=0,0287$). Houve correlação entre as expressões das duas moléculas dentro do grupo do CCE e do TCB ($p<0,05$). Em conclusão, o resultado deste estudo é condizente com o comportamento

biológico do CCE e TCB, e que estas duas moléculas podem servir como marcadores de prognóstico para estes tumores.

Palavras-chave: cães, carcinoma de células escamosas, E-caderina, imunoistoquímica, neoplasia, tumor de células basais, VEGF

E-cadherin and vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma and in basal cell tumors in dogs.

ABSTRACT – The squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant epithelial neoplasm of keratinocytes and accounts for about 5% of the canine skin neoplasms. The basal cell tumors (BCT) are made up almost entirely of basal cells and accounts for 4 to 12% of the canine skin neoplasms. Squamous cell carcinoma and basal cell tumor are neoplasms commonly seen in the Small Animal Practice. The cadherins are a group of cellular adhesion molecules that are expressed on the surface of all epidermic layer. The E-cadherin is the main cadherin involved in epithelial cellular adhesion; the decrease in its expression is related to the progression of some types of cancer, specially carcinomas, to its metastatic characteristics, and to the prognosis. There are few studies in Veterinary Medicine researching the expression of this molecule in canine tumors. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent mitogen to endothelial cells and its expression has been correlated with increased tumoral angiogenesis. Besides stimulating angiogenesis, VEGF produces collagenase and other enzymes thus helping neoplastic cells scape into the vascular system and stimulating tumoral cell growth. The goal of this study was to evaluate E-cadherin's and vascular endothelial growth factor expression in canine tissues that were classified as squamous cell carcinoma or basal cell tumor, and to find a correlation with the histological grade of the tumors. Both normal and decreased expression of E-cadherin had significant differences when comparing squamous cell carcinoma to basal cell tumor using the Fisher test ($P=0,0039$). Also, in some samples the more differentiated neoplastic cells had a higher intensity of color than the less differentiated ones. The positive and negative expression of VEGF also had a significant difference when evaluated by the Fisher test ($P=0,0287$). There was a correlation among the two molecules' expression with SCC and BCT ($p<0,05$). In conclusion, this study shows that the results correspond with the biological behavior of SCC and BCC and these molecules may have prognostic value for these neoplasms.

Keywords: dogs, squamous cell carcinoma, E-cadherin, immunohistochemistry, neoplasia, basal cell tumor, VEGF.

1- INTRODUÇÃO

A incidência de tumores em cães vem crescendo consideravelmente, e acredita-se ter várias razões, entre elas está o aumento da longevidade observada nestes animais. Hoje, os tumores são uma das principais causas de morte em cães e, por isso, têm assumido uma importância excepcional na nossa sociedade.

A pele é a maior barreira entre o organismo animal e o ambiente em que ele vive. Assim, ela fica exposta a um grande número de agentes carcinogênicos, o que se reflete numa variedade de tumores cutâneos primários, visto que a pele é um dos principais sítios de tumores nos animais.

Tumores em humanos e animais são temas de muitos estudos. Apesar disso, o tratamento deles ainda é um grande desafio para médicos e veterinários.

Estudos que enfoquem os mecanismos envolvidos na instalação, desenvolvimento e definição de prognóstico dos tumores se tornam muito importantes nessa luta.

A definição do prognóstico de um paciente depende do tipo de tumor, de seu grau histológico, de moléculas expressas por ele, entre outros. Várias dessas moléculas expressas pelo tumor são alvo de terapia. É cada vez mais freqüente o uso de diferentes terapias no combate ao câncer, graças a pouca eficiência ou aos efeitos adversos causados por terapias convencionais, como quimioterapia e radioterapia.

Dessa maneira, conhecer a expressão de algumas moléculas nas células de um tumor pode ser útil, não só para o estabelecimento de um prognóstico, como para a escolha do melhor tratamento. Também pode-se vislumbrar terapias por meio de produção de anticorpos específicos, destinados a neutralizar a expressão dessas moléculas.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia maligna que emerge dos queratinócitos (SCOTT et al., 1996) e corresponde a aproximadamente 5% dos tumores cutâneos dos cães (THOMAS & FOX, 1998).

Animais velhos são os mais acometidos, com a média de idade variando de 8 a 10 anos, embora também haja relatos em animais jovens, de 2 aos 5 meses de idade (THOMAS & FOX, 1998). Não há predileção sexual (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996) e as raças mais acometidas são o terrier escocês, pequinês, boxer, poodle, elkhound norueguês e o teckel (SCOTT et al., 1996; THOMAS & FOX, 1998).

Cães de raças de pêlo curto e pele branca ou albina apresentam incidência mais elevada de carcinoma de células escamosas induzido pela luz solar. Estes cães geralmente passam muitas horas deitados ao sol (SCOTT et al., 1996).

Há evidências que viroses possam participar do desenvolvimento de alguns casos de carcinoma de células escamosas. Foram demonstrados antígenos estruturais de papiloma vírus (ZAUGG et al., 2005), entretanto, a etiologia desses tumores não está clara em todos os casos e acredita-se que fatores ambientais e características do próprio animal possam também estar envolvidos (THOMAS & FOX, 1998).

As lesões proliferativas ou ulcerativas ocorrem mais comumente em tronco, membros, dedos, escroto, lábios, nariz, pálpebras e pavilhão auricular (SCOTT et al., 1996; THOMAS & FOX, 1998). As proliferativas são massas papilares de tamanhos variados, com aspecto de couve-flor ou de cornos cutâneos na superfície da lesão, que freqüentemente é ulcerada e sangra facilmente. As ulcerativas se iniciam como úlceras pouco profundas e crostosas e se tornam profundas e crateriformes (PULLEY & STANNARD, 1990; SCOTT et al., 1996; THOMAS & FOX, 1998). Este tipo de tumor normalmente é único, mas pode ser múltiplo no tronco de animais que se expõe ao sol, ou em leito ungueal de animais de porte grande (SCOTT et al., 1996).

Os carcinomas de células escamosas são tumores, geralmente, invasivos localmente, mas de crescimento lento para gerar metástases (PULLEY & STANNARD, 1990; SCOTT et al., 1996). Lesões do leito ungueal parecem ser mais agressivas (cerca de 70% invadem o tecido ósseo da terceira falange) e se metastizam mais freqüentemente (cerca de 22% para o linfonodo regional) (SCOTT et al., 1996).

Histologicamente, os carcinomas de células escamosas são formados por massas irregulares de células escamosas, cuja origem são os queratinócitos que proliferam e invadem a derme e o subcutâneo. A presença de queratina é um achado comum nestes tumores, e sua quantidade depende do grau de maturação das células neoplásicas. Um grande número de pérolas córneas está presente em tumores bem diferenciados. Elas são compostas por camadas de células escamosas que vão aumentando gradualmente sua queratinização em direção ao centro. Em tumores pouco diferenciados, isoladas células queratinizadas podem ser vistas. As células são grandes e arredondadas, possuem citoplasma abundante e eosinofílico e núcleo picnótico. Pontes intercelulares podem ser encontradas facilmente (PULLEY & STANNARD, 1990). Figuras mitóticas são normalmente numerosas e estão relacionadas com o grau de anaplasia. Quanto maior o grau de anaplasia dessas células, maior a variação no tamanho nuclear, menor a massa citoplasmática com aumento da basofilia destas células e o desaparecimento das pontes intercelulares (YAGER & SCOTT, 1985).

O tratamento pode ser por excisão cirúrgica, criocirurgia, eletrocirurgia, hipertermia e radioterapia. O prognóstico é melhor para tumores bem diferenciados. Tumores com alto grau de invasão e margens pobremente definidas apresentam um mau prognóstico, com recorrência do tumor após tratamento (SCOTT et al., 1996).

2.2- Tumor de células basais

Os tumores de células basais são compostos quase exclusivamente por células basais. Não exibem evidências de diferenciações de glândulas sebáceas, sudoríparas e de folículos pilosos. Tumor basalóide, epitelioma de células basais e carcinoma de células basais são termos usados para descrever este tumor. Apresentam uma

incidência de 4 a 12% entre as neoplasias cutâneas caninas (PULLEY & STANNARD, 1990; SCOTT et al., 1996).

Acometem, principalmente, animais com idade média entre 6 e 10 anos. Pulley & Stannard (1990) afirmam que animais machos têm uma maior predisposição, enquanto que Scott et al. (1996) e Vail & Withrow (1996) acreditam não haver predisposição sexual. As raças mais acometidas são o cocker spaniel, kerry blue terrier, shetland sheepdog, huskie siberiano, springer spaniel inglês, poodle e o bichon friesé (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996; THOMAS & FOX, 1998). Em humanos, a incidência desse tumor está relacionada com a exposição crônica à luz ultravioleta (SCOTT et al., 1996; THOMAS & FOX, 1998).

Geralmente estes tumores são solitários, envolvem a derme e o subcutâneo (PULLEY & STANNARD, 1990); ocorrem principalmente na cabeça, pescoço ou tórax, sendo, usualmente circunscritos, firmes, císticos, arredondados, medindo de 0,5 a 10cm de diâmetro e normalmente são alopecicos, ulcerados e pigmentados (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996).

O tumor de células basais apresenta células com núcleo oval proeminente e citoplasma relativamente pequeno, ocasionalmente podem conter células basais com formato fusiforme e núcleo alongado. Estas células são normalmente pequenas e uniformes, apresentam o núcleo hipercromático e se parecem bastante com as células basais da epiderme. A diferença está no fato que as células desses tumores não possuem pontes intercelulares, como as da epiderme. Os limites celulares são pouco definidos, dando a impressão que os núcleos estejam embebidos em uma massa citoplasmática. Figuras mitóticas e melanina podem ser observadas e estarem em grande quantidade em alguns tumores (PULLEY & STANNARD, 1990).

Os tumores de células basais podem ser classificados histologicamente como sólidos, císticos, adenóides ou medusóides. Os tumores sólidos são compostos por células de tamanhos variados. O núcleo da camada periférica dessa massa celular é freqüentemente em paliçada, perpendicular ao tecido conjuntivo adjacente, no entanto, alguns núcleos podem ser arranjados ao acaso. Os tumores císticos diferem dos tumores sólidos apenas pela presença de espaços císticos no centro dos aglomerados de células tumorais. No tumor tipo adenóide, as células são arranjadas na forma de

cordões entrelaçados. Os cordões consistem de uma, duas ou três filas de células em paliçadas. O estroma entre os cordões de células pode sofrer degeneração mucinosa, dando uma aparência glandular bem definida ao tumor. O tumor medusóide é formado por ilhas sólidas de células basais com cordões de células basais projetados para fora, semelhante a tentáculos de um polvo. As células basais no centro destas ilhas são sempre alongadas e arrançadas de forma paralela. Esta classificação dos tumores pode mudar consideravelmente e observar-se vários padrões no mesmo tumor (PULLEY & STANNARD, 1990).

Os tumores de células basais apresentam crescimento lento (VAIL & WITHROW, 1996; THOMAS & FOX, 1998) e a incidência de recidivas e metástases é muito baixa (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996; THOMAS & FOX, 1998).

O tratamento pode ser por excisão cirúrgica, eletrocirurgia, criocirurgia (SCOTT et al., 1996), radioterapia e quimioterapia. A excisão cirúrgica é, normalmente, curativa (THOMAS & FOX, 1998).

2.3- Moléculas de adesão

As moléculas de adesão celular (MACs) são glicoproteínas de membrana, cujas funções compreendem o reconhecimento e a adesão celular e possuem enorme importância em múltiplos processos biológicos, tanto normais como patológicos. São descritas cinco famílias de moléculas de adesão: a superfamília das imunoglobulinas, as selectinas, caderinas, integrinas e as proteínas da matriz extracelular (ELANGBAM et al., 1997).

As MACs são receptores celulares que se encontram na superfície celular e na matriz extracelular, por meio dos quais efetuam-se as interações específicas célula-célula e célula-matriz (ELANGBAM et al., 1997). A adesão celular determina a organização das células em órgãos e tecidos; também é importante nos processos de migração e diferenciação celular. Participa de fenômenos como a embriogênese, reparação tissular, inflamação, hemostasia, processos linfoproliferativos e neoplásicos. As MACs unem-se a contra-receptores específicos encontrados em outras células ou na matriz extracelular, facilitando as interações celulares e a migração delas por

diferentes tecidos. Transportam sinais reguladores da transcrição celular depois da interação com seus ligantes. As moléculas de adesão mediam um diálogo, transferindo informação em duas direções, através da membrana celular (COHEN et al., 1997).

Também as MACs estão envolvidas na interação entre células e entre células e matriz celular em tumores malignos e benignos (DENTON et al., 1992). Desempenham um papel importante na progressão do câncer, no seu desenvolvimento, invasão e geração de metástases (OKEGAWA et al., 2004). A expressão de moléculas de adesão e seus ligantes nos tumores podem estar relacionados com seu grau de malignidade e seu poder de gerar metástases (WITZ, 2006).

2.3.1- Caderinas

As caderinas representam uma classe de moléculas de adesão. Elas ainda são divididas em subfamílias: clássicas ou caderinas tipo I, atípicas ou caderinas tipo II, desmocolinas, desmogleinas, protocaderinas e caderinas Flamingo (FOTY & STEINBERG, 2004). As caderinas clássicas compreendem a E (epithelial)-caderina, N (neural)-caderina, P (placental)-caderina, entre outras (FURUKAWA et al., 1997; FOTY & STEINBERG, 2004). Elas são polipeptídios que conectam uma célula a outra através de uma ligação homofílica dependente do íon cálcio. Se associam a um grupo de proteínas intracelulares chamadas cateninas, as quais as ligam a microfilamentos actínicos do citoesqueleto e mediam mecanismos transdutores de sinais que regulam o crescimento celular e sua diferenciação. Existem três tipos de cateninas: β , α e γ (OZAWA & KEMLER, 1998).

A manutenção da arquitetura do tecido adulto depende grandemente da integridade funcional e estrutural das caderinas (ELANGBAM et al., 1997). São consideradas importantes reguladoras da morfogênese em vários órgãos, incluindo a pele. Elas estão envolvidas não somente na manutenção do arranjo destas células, como na condensação dérmica (HIRAI et al., 1989). Além disso, também são importantes na embriogênese (FURUKAWA et al., 1997).

Na pele humana, a E-caderina é expressa na superfície celular de todas as camadas epidérmicas, incluindo os apêndices cutâneos, enquanto a P-caderina é

expressa somente nas células da camada basal (FUJITA et al., 1992). Ultra-estruturalmente, a E-caderina é distribuída pela membrana plasmática dos queratinócitos, mas não na superfície dérmica das células basais. Depósitos densos de E-caderina são encontrados no espaço intercelular dos desmossomos (HORIGUCHI et al., 1994).

Uma disfunção das caderinas pode estar envolvida com várias desordens cutâneas, como doenças bolhosas e comportamento invasivo e metastático dos tumores (FURUKAWA et al., 1997).

A função deficiente das caderinas tem sido associada com câncer de pele em humanos e o aparecimento de metástases. Estudos sugerem que a perda da E-caderina pode estar associada com a progressão do tumor, sendo sua principal ação a supressão da habilidade de invasão (BEHRENS et al., 1989; NAVARRO et al., 1991; BIRCHMEIER et al., 1993). A perda funcional da E-caderina pode ocorrer por vários mecanismos, mas é freqüentemente envolvida com deleção ou mutação do gene CDH1. Alguns estudos mostram que aberrações neste gene são suficientes para predispor ao desenvolvimento de tumores malignos. Além disso, mudanças na expressão de proteínas que fazem parte do complexo de adesão da E-caderina também podem prejudicar sua função. A reorganização da cromatina, a hipermetilação e a perda do fator de transcrição coincidem com a supressão da E-caderina em carcinomas (SEMB & CHRISTOFORI, 1998). De qualquer maneira, a integridade do tecido é destruída e a célula tumoral fica livre para gerar metástases (GOODSELL, 2002).

Em humanos, a expressão de E-caderina é preservada em tumores de células basais dos tipos superficial e nodular (PIZARRO et al., 1994; SHIRAHAMA et al., 1996) e é reduzida no tumor infiltrativo, sugerindo que ela pode estar relacionada com o padrão de crescimento e com o comportamento agressivo desse tumor (PIZARRO et al., 1994). Contrariamente, Tada e colaboradores (1996) relatam que a expressão da E-caderina foi preservada nos casos de tumor de células basais e reduzida nos casos de carcinoma de células escamosas.

As expressões de E e P-caderina também foram relacionadas com o grau de diferenciação do carcinoma de células escamosas, e redução marcante de E-caderina

foi associada com o aparecimento de metástases em linfonodos (FURUKAWA et al., 1994; SHIRAHAMA et al., 1996). Um estudo de Schipper (1991) mostrou que a expressão de E-caderina em tumores epiteliais humanos bem diferenciados é similar a do epitélio normal e, em carcinomas moderadamente diferenciados, a expressão é intermediária. Já em tumores pobremente diferenciados não há expressão de caderinas. Os autores sugerem que estes achados podem ter implicação no prognóstico dos tumores.

O grau de malignidade de outros tipos de tumores humanos também está correlacionado com a expressão da E-caderina. Em tumor de mama, a perda parcial ou completa da expressão da E-caderina está diretamente ligada ao grau histológico do tumor (MOLL et al., 1993) e ao prognóstico desfavorável (SIITONEN et al., 1996). Em carcinoma de bexiga (SYRIGOS et al., 1995), carcinoma gástrico (JAWHARI et al., 1997) e carcinoma prostático (RICHMOND et al., 1997), a perda da expressão de E-caderina também foi relacionada com alto grau histológico, estágio avançado e prognóstico pobre. Também, a baixa expressão da E-caderina em carcinoma oral de células escamosas foi correlacionada com mau prognóstico (BÁNKFALVI et al., 2002). Outro estudo avaliou a expressão da E-caderina no epitélio oral normal, na displasia oral leve ou moderada, no carcinoma oral *in situ*, no carcinoma oral microinvasivo e no carcinoma oral de células escamosas. A perda da expressão da E-caderina foi maior quanto maior o grau de displasia da lesão (GARCIA et al., 2006).

Em cães, a expressão de P-caderina foi avaliada em tecidos mamários (normais, hiperplásicos, com tumores benignos e malignos), e neste estudo foram encontradas marcações aberrantes nos tecidos neoplásicos, com correlação positiva entre a intensidade da expressão da P-caderina e o tipo histológico nos tumores malignos (PAREDES et al., 2004). Outro estudo com a marcação de E-caderina em tumores mamários caninos associou a redução da sua expressão com o caráter invasivo do tumor, a presença de vasos, tamanho, ulceração, metástases em linfonodos, necrose, mas não houve correlação com o grau histológico do tumor (MATOS et al., 2006).

2.4- Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

Angiogênese é um processo pelo qual novos vasos sanguíneos se desenvolvem a partir do endotélio de uma vasculatura pré-existente (FOLKMAN & SHING, 1992). Folkman (1990) demonstrou que a angiogênese foi essencial para o crescimento de tumores sólidos e suas metástases em humanos. Ela é um importante componente para o crescimento tumoral e, provavelmente, toma lugar na cascata de eventos biológicos envolvidos na formação de metástase tumoral. Estudos mostram que tumores mais vascularizados estão associados com o aumento de risco de metástases e prognóstico menos favorável (TAKAHASHI et al., 1995).

O VEGF além de estimular a angiogênese, produz collagenase e outras enzimas degradativas que facilitam a saída da célula neoplásica para a circulação (MOSCATELLI et al., 1981), e também estimula o crescimento das células tumorais (WEIDNER, 1998). Ele é um potente mitógeno para células e o aumento de sua expressão tem sido correlacionado com o aumento de angiogênese tumoral (CRESSEY et al., 2005). O VEGF é uma glicoproteína dimétrica de 46kDa que estimula a proliferação endotelial *in vitro* e a angiogênese *in vivo* (LEUNG et al., 1989) e aumenta a permeabilidade vascular (DVORAK et al., 1995). Pouco se sabe sobre o real papel do VEGF nos tumores dos animais.

Maiolino e colaboradores (2000) observaram a expressão do VEGF no carcinoma de células escamosas e basais em cães. Constataram que todas as amostras de carcinoma de células escamosas foram marcadas e a marcação foi praticamente nula no carcinoma de células basais. Os autores correlacionaram a alta expressão do VEGF no carcinoma de células escamosas ao seu comportamento invasivo, quando comparado com o comportamento menos agressivo do carcinoma de células basais, e concluíram que este pode ser um critério de avaliação da malignidade e do potencial de crescimento para estes tipos de tumores.

Restucci e colaboradores (2002) desenvolveram um estudo comparativo da expressão do VEGF entre diversos tumores mamários caninos benignos e de malignidade graus 1, 2 e 3. O resultado mostrou um aumento progressivo da expressão do VEGF concordante com o aumento do grau de malignidade desses tumores.

Também mostrou que a densidade da microvasculatura nesses tumores teve o mesmo comportamento da expressão do VEGF, concluindo que a malignidade e a angiogênese aumentam juntas.

Outro trabalho dos mesmos autores correlaciona o aumento da expressão do VEGF com o aumento do seu receptor específico (Flk-1) nos tumores mamários caninos, mostrando também aumento progressivo, de acordo com a malignidade do tumor, o que sugere a ação local do VEGF estimulando o crescimento do tumor (RESTUCCI et al., 2004). Restucci e colaboradores (2003) também quantificaram a expressão do VEGF correlacionando-a com a densidade da microvasculatura em cortes de testículos normais comparando-os com seminomas de cães. Observaram aumento da expressão de VEGF e da densidade da microvasculatura nos tecidos neoplásicos, quando comparados com o normal. Os seminomas difusos ainda apresentavam aumento significativamente maior que os seminomas intratubulares, mostrando que nesses tumores testiculares, o uso destes parâmetros pode ser útil como critério de avaliação da malignidade.

A expressão do VEGF em meningiomas de cães foi estudada por Platt e colaboradores (2006). A alta expressão desta molécula foi relacionada com um pequeno tempo de sobrevivência do animal, o que pode significar um parâmetro auxiliar no prognóstico.

3- OBJETIVOS

Sabendo-se que o carcinoma de células escamosas tem um comportamento mais agressivo que o tumor de células basais, buscou-se com este estudo:

- Relacionar o tipo de tumor com os dados do animal (idade, raça, sexo);
- Relacionar a expressão da E-caderina e do VEGF com o tipo histológico do tumor, grau de diferenciação e comportamento biológico;
- Avaliar se a expressão da E-caderina e do VEGF poderiam auxiliar na definição de um prognóstico para o animal.

4- MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de tumor de células basais e de carcinoma de células escamosas foram submetidas ao método de imunoistoquímica para detecção da molécula de adesão E-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular.

4.1- Obtenção das amostras

Foram empregados 35 espécimes de tecidos tumorais caninos, incluídos em parafina e previamente classificados histologicamente como carcinoma de células escamosas (n=20) e tumor de células basais (n=15). Os espécimes foram obtidos dos arquivos dos Departamentos de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal, cedidos pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi; da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus de Botucatu, pela Prof^a Dr^a Renée L. Amorim e da Faculdade de Odontologia da UNESP, campus de Araçatuba, pelo Prof^a Dr^a Gisele F. Machado.

4.2- Histopatologia

Os espécimes neoplásicos foram submetidos aos procedimentos de rotina de fixação e inclusão em parafina do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal, SP. Cortes de cinco micrômetros de espessura, corados pela Hematoxilina-Eosina, foram confeccionados e examinados (Figura 1), o que permitiu confirmar o diagnóstico e classificá-los segundo os critérios de PULLEY & STANNARD (1990).

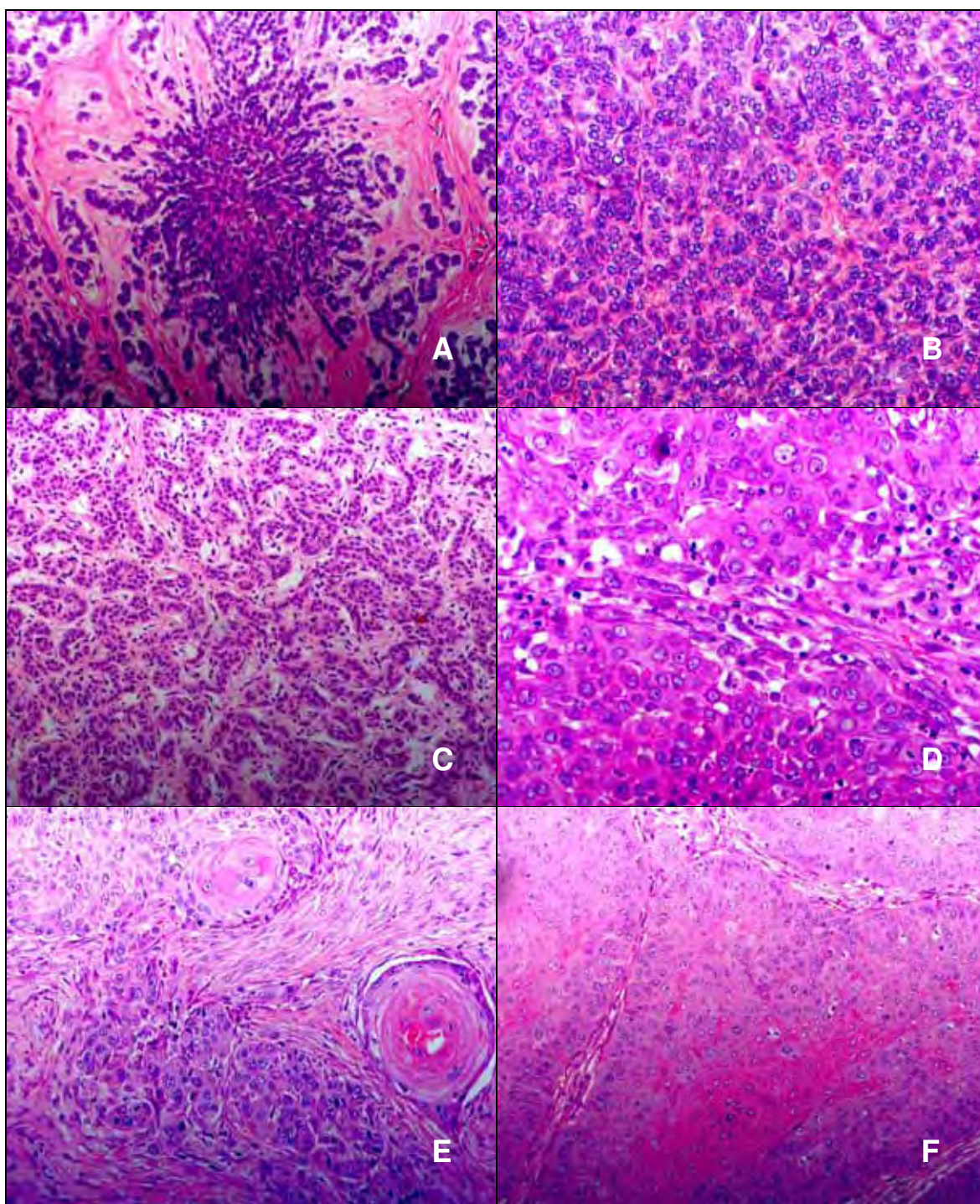


Figura 1- Fotomicrografia dos tumores caninos empregados neste estudo: (A) TCB do tipo medusóide (x200); (B) TCB do tipo sólido (x400); (C) TCB do tipo adenóide (x200); (D) CCE não queratinizado (x400). (E e F) CCE queratinizado (x200); Coloração pela Hematoxilina & Eosina.

3.3- Reação de imunoistoquímica

O método de imunoistoquímica usado foi o complexo streptoavidina biotina (ABC) desenvolvido por HSU et al. (1981).

Cortes de 3µm de espessura foram montados em lâminas pré-tratadas com Poly-L-Lisina (cód. P4832 – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EUA). No momento da reação, as lâminas foram deixadas em estufa a 37°C por 1,5 hora. A desparafinização e a reidratação foram feitas em baterias de xilóis e álcoois em concentrações decrescentes. Após lavagem em água destilada, receberam tratamento com solução de metanol e peróxido de hidrogênio (2,4%) para bloqueio da peroxidase endógena, uma vez durante 10 minutos, especificamente para o anticorpo anti-E-caderina (E-caderina) e quatro vezes para o anticorpo anti-VEGF (VEGF).

Para a recuperação antigênica, os espécimes receberam tratamento em banho-maria por 40 minutos em solução pré-aquecida a 92°C, de tampão citrato (pH 6) para a reação com a E-caderina e em tampão tris EDTA (pH 9) para a reação com o VEGF. Depois de resfriados, foram incubados com Protein Block (DakoCytomation, Ref. X0909) para bloqueio de reações inespecíficas por 30 minutos. Em seguida, foram incubados durante a noite a 4°C com o anticorpo primário em câmara úmida e cobertos com parafilme. Os anticorpos primários utilizados foram o anticorpo monoclonal anti-E-caderina (camundongo anti-humano) e o anticorpo monoclonal anti-VEGF (camundongo anti-humano) (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos primários, diluição e recuperações antigênicas empregadas.

ANTICORPOS PRIMÁRIOS	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA E TAMPÃO EMPREGADO
Anti-VEGF ^a	1/10	calor (banho-maria) tampão Tris EDTA (pH 9)
Anti-E-Caderina ^b	1/100	calor (banho-maria) tampão citrato (pH 6)

a - Sigma-Aldrich Co - clone 26503.11; b – Zymed Laboratories Inc., clone 4A2C7

Para detecção da E-caderina foi utilizado o kit LSAB (Sistema de Detecção Ultra Estreptavidina Universal, DakoCytomation, Ref. K0690), por 30 minutos; e para o anticorpo anti-VEFG foi utilizado o kit Envision (Dual Link System, DakoCytomation, Ref. K4061), por uma hora. As reações foram reveladas pelo substrato cromogênico 3,3 diaminobenzidina (Cód. SK-4100 - DAB Vector Laboratórios, Burlingame, CA, EUA), e contracolorados pela hematoxilina de Harris por um minuto, e então lavados em água corrente.

Após cada um dos tratamentos recebidos, as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, três vezes por cinco minutos cada, excetuando-se a etapa entre o bloqueio das proteínas inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário.

A desidratação dos cortes foi feita em gradiente crescente de álcoois e xilóis, seguidas pela montagem em lamínula em meio permanente bálsamo do Canadá.

Como controle negativo, os anticorpos primários anti-E-caderina e anti-VEGF foram substituídos por tampão PBS ou imunoglobulina G de camundongo.

Na reação com a E-caderina, como controle positivo, além das áreas de epitélio normal dos próprios cortes, foram utilizados cortes de útero canino, que sabidamente expressam a E-caderina em sua camada epitelial. Para o VEGF, foram utilizados hemangiossarcomas caninos.

Para avaliação dos resultados foram consideradas expressões normais de E-caderina as marcações de coloração moderada a intensa em mais de 75% das células neoplásicas e expressão reduzida as demais, seguindo os critérios empregados por Brunetti et al. (2005). E para o anticorpo anti-VEGF, foram consideradas positivas marcações de coloração moderada a intensa em mais de 25% das células neoplásicas e negativas as demais (KYZAS et al., 2005).

As observações foram feitas em microscópio óptico comum por dois observadores, e os resultados foram então estabelecidos.

4.3- Análise estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a expressão da E-caderina e do VEGF entre os tecidos caninos classificados histologicamente como carcinoma de células escamosas e tumor de células basais e o teste de correlação de Spearman para correlacionar a expressão da E-caderina com a expressão do VEGF, através do programa SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

5- RESULTADOS

5.1- Diagnóstico histopatológico e dados dos animais

A classificação histopatológica dos tumores, juntamente com as raças, sexo e idades dos cães acometidos estão expostos nas Tabelas 2 e 3.

Dos 20 cães que receberam o diagnóstico de carcinoma de células escamosas (CCE), nove (45%) eram SRD (sem raça definida), quatro (20%) boxer, dois (10%) rottweiler e um exemplar (5%) das demais raças (weimaraner, dog alemão, basset hound, fila brasileiro e dálmata). A média das idades foi de 7,45 anos, variando de dois a 18 anos. A porcentagem de cães machos foi de 55% (11) e de 45% (nove) de fêmeas. Quinze cães apresentaram o CCE do tipo queratinizado (CCEQ) e cinco não queratinizado (CCENQ). Estes dados estão representados nas Figuras 2 e 4.

Tabela 2- Classificação histopatológica dos carcinomas de células escamosas, informando as raças, idades e sexo dos animais acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.

Nº	RAÇA	SEXO	IDADE	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA
1	SRD*	macho	6 anos	CCE queratinizado
2	boxer	macho	8 anos	CCE não queratinizado
3	SRD	macho	3 anos	CCE queratinizado
4	weimaraner	macho	5 anos	CCE não queratinizado
5	dog alemão	macho	9 anos	CCE queratinizado
6	basset hound	fêmea	7 anos	CCE queratinizado
7	rottweiler	fêmea	5 anos	CCE bem queratinizado
8	boxer	fêmea	2 anos	CCE queratinizado
9	fila brasileiro	macho	6 anos	CCE queratinizado
10	SRD	fêmea	14 anos	CCE não queratinizado
11	SRD	macho	9 anos	CCE queratinizado
12	rottweiler	macho	6 anos	CCE queratinizado
13	SRD	fêmea	9 anos	CCE queratinizado
14	boxer	macho	7 anos	CCE não queratinizado
15	SRD	fêmea	18 anos	CCE queratinizado
16	SRD	macho	8 anos	CCE queratinizado
17	boxer	fêmea	7 anos	CCE não queratinizado
18	dálmata	fêmea	3 anos	CCE queratinizado
19	SRD	macho	5 anos	CCE queratinizado
20	SRD	fêmea	12 anos	CCE queratinizado

*SRD = sem raça definida

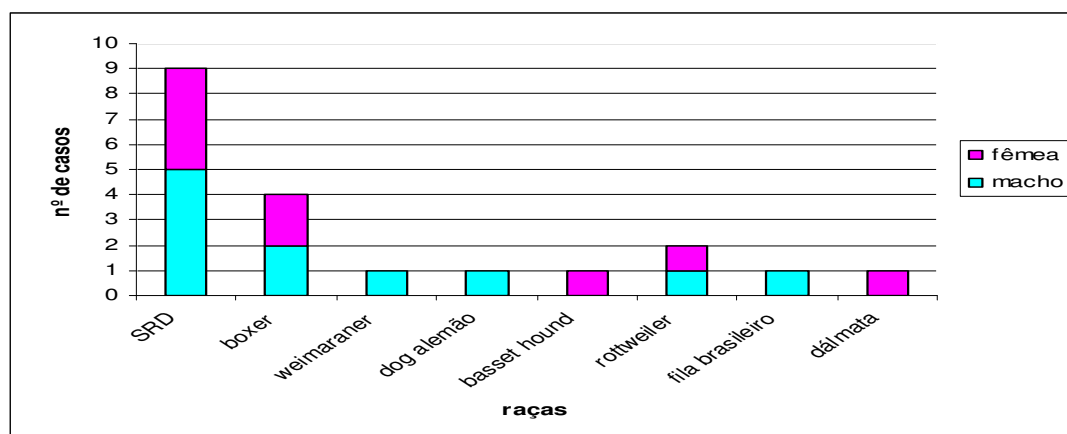


Figura 2- Frequência dos carcinomas de células escamosas, distribuídas conforme a raça e sexo dos cães acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.

Dos 15 cães com tumor de células basais (TCB), seis (40%) eram da raça poodle, dois (13,3%) pastor alemão e um exemplar (6,7%) das demais raças (husky siberiano, cocker spaniel, bichon frisé, old english sheepdog, yorkshire, SRD e setter irlandês). A média de idade dos animais acometidos por tumor de células basais foi de sete anos, variando de dois a 15. A porcentagem de cães machos foi 53,3% (8) e a de fêmeas 46,7% (7). Quatro (26,7%) dos tumores de células basais foram do tipo sólido, três (20%) do tipo medusóide e oito (53,3%) do tipo adenóide. Os dados estão representados nas Figuras 3 e 4.

Tabela 3- Classificação histopatológica dos tumores de células basais, informando as raças, idades e sexo dos animais acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.

Nº	RAÇA	SEXO	IDADE	CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA
1	pastor alemão	fêmea	5 anos	TCB do tipo medusóide
2	poodle	fêmea	9 anos	TCB do tipo adenóide
3	husky siberiano	fêmea	6 anos	TCB do tipo sólido
4	cocker	macho	8 anos	TCB do tipo adenóide
5	bichon frisé	macho	9 anos	TCB do tipo adenóide
6	poodle	macho	8 anos	TCB do tipo medusóide
7	poodle	fêmea	12 anos	TCB do tipo sólido
8	poodle	macho	2 anos	TCB do tipo adenóide
9	poodle	fêmea	5 anos	TCB do tipo sólido
10	sheepdog	macho	4 anos	TCB do tipo adenóide
11	yorkshire	macho	4 anos	TCB do tipo adenóide
12	poodle	macho	4 anos	TCB do tipo adenóide
13	SRD*	macho	15 anos	TCB do tipo sólido
14	pastor alemão	fêmea	7 anos	TCB do tipo adenóide
15	setter irlandês	fêmea	5 anos	TCB do tipo medusóide

* SRD = sem raça definida

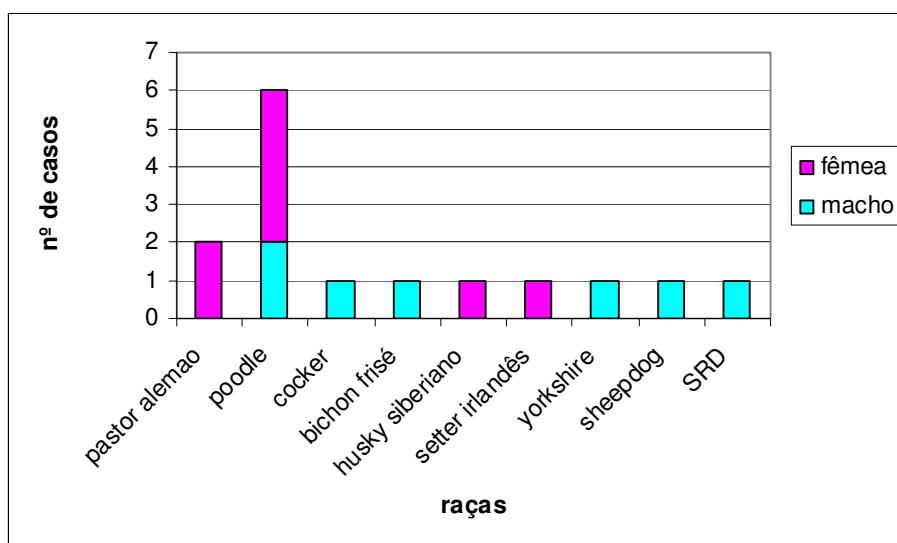


Figura 3- Frequência dos tumores de células basais, distribuídas conforme a raça e sexo dos cães acometidos. UNESP - Jaboticabal, SP, 2007.

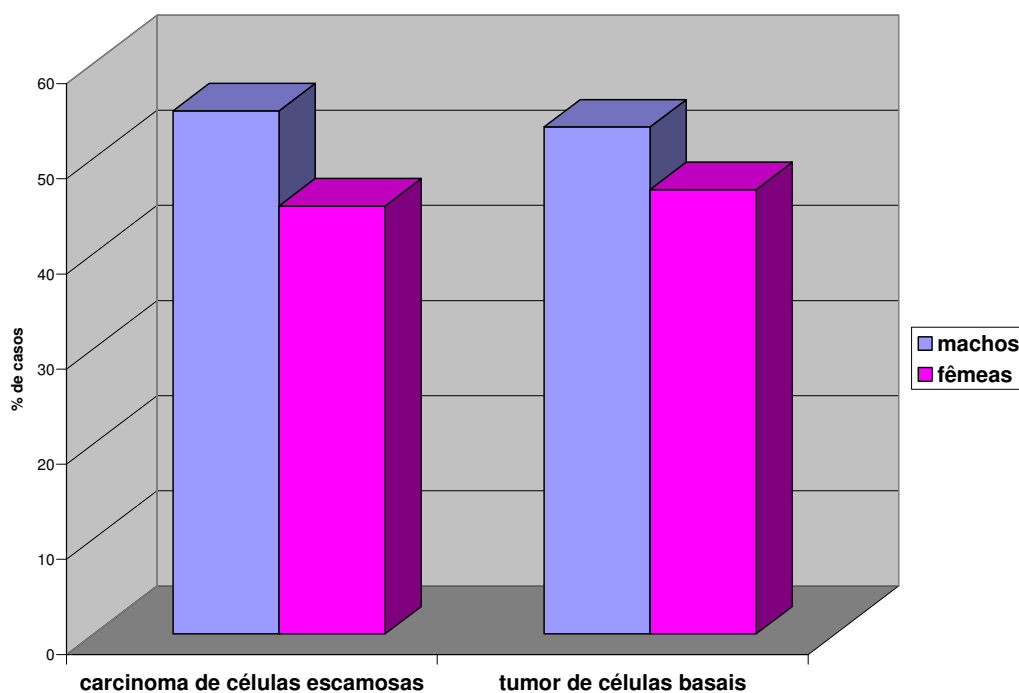


Figura 4- Porcentagem de cães machos e fêmeas com carcinoma de células escamosas e com tumor de células basais. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

5.2- Expressão de E-caderina

Considerando a expressão normal de E-caderina em uma porcentagem maior que 75% das células neoplásicas marcadas e uma porcentagem inferior a isso como expressão reduzida da molécula, das 20 amostras de CCE, 14 (70%) apresentaram redução de expressão e seis (30%) expressão normal da molécula. O inverso foi visto no TCB, em três (20%) amostras a expressão estava reduzida e em 12 (80%), a expressão foi preservada. Os dados estão apresentados na Figura 5. Há diferença significativa entre o CCE e o TCB na expressão dessa molécula quando comparada pelo teste de Fisher ($P=0,0039$) a 1% de significância (Tabela 4). Exemplos de marcação normal, reduzida e controle positivo do próprio corte estão representadas nas Figuras de 6 a 8.

Foi observado que em algumas amostras, a expressão da E-caderina apresentou diferentes padrões de coloração de acordo com o grau de diferenciação das células neoplásicas. Onde células mais diferenciadas apresentavam marcação mais intensa que as menos diferenciadas (Figura 9).

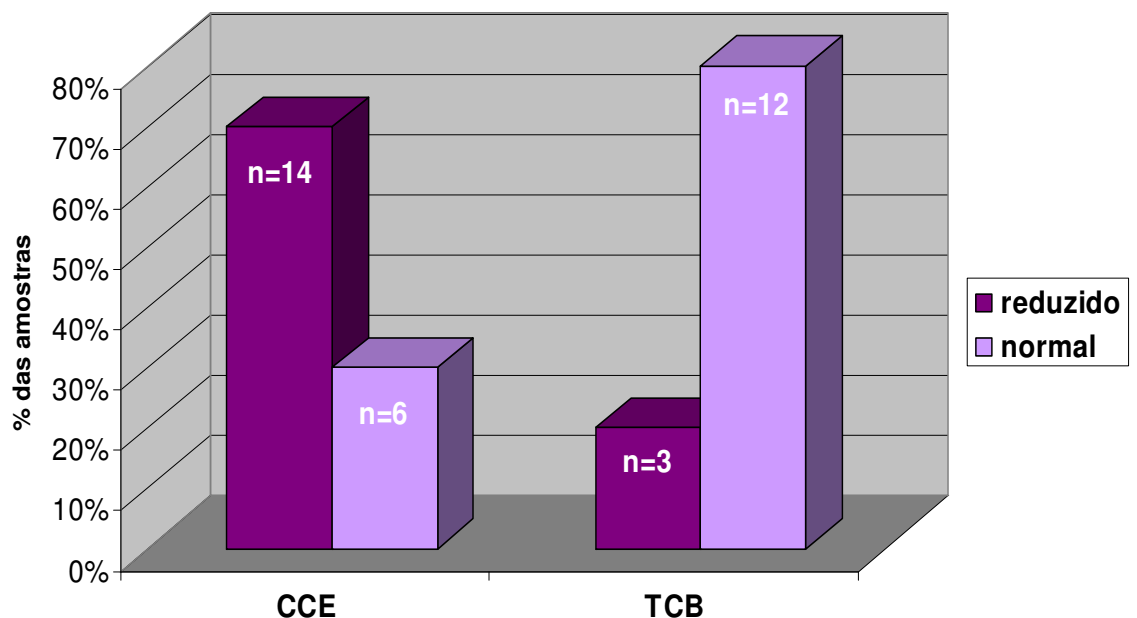
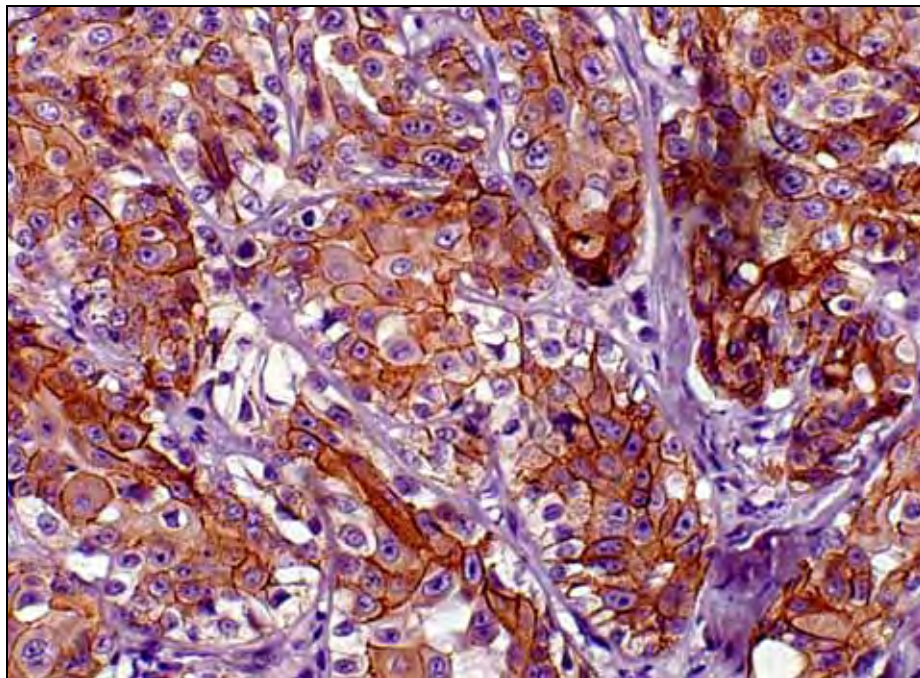


Figura 5- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE e de TCB mostrando a expressão normal e reduzida da molécula E-caderina. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

Tabela 4- Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina no CCE e no TCB.

		reduzida	normal	total
CCE	freqüência	14	6	20
	expectativa	9,7143	10,286	
	porcentagem	40,00	17,14	57,14
TCB	freqüência	3	12	15
	expectativa	7,2857	7,7143	
	porcentagem	8,57	34,29	42,86
Total	freqüência	17	18	35
	porcentagem	48,57	51,43	100,00

P=0,0039 (p<0,01)

**Figura 6-** Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão normal de E-caderina, com mais de 75% de células neoplásicas marcadas com coloração intensa no CCE queratinizado (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

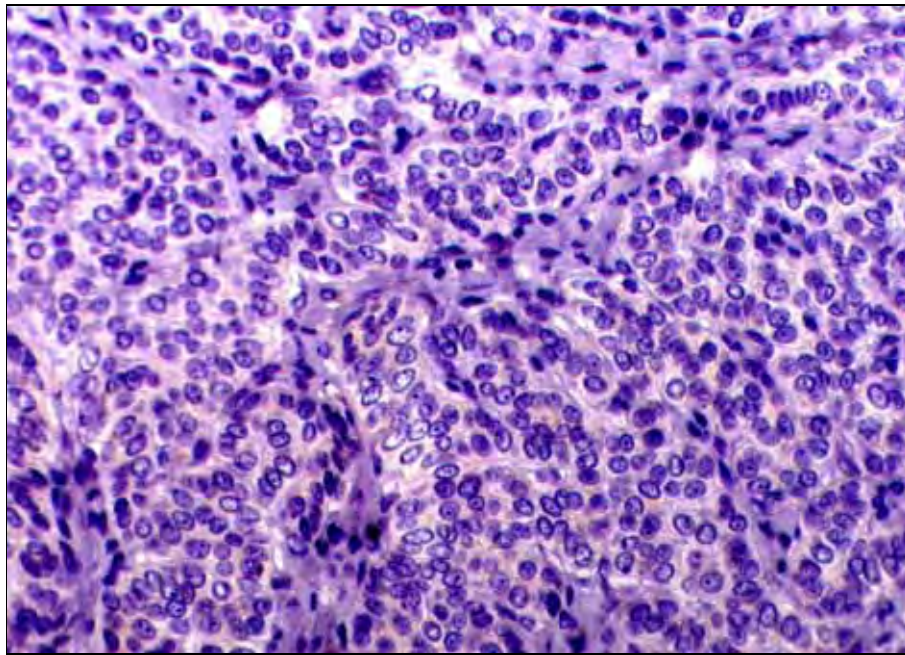


Figura 7- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão negativa de E-caderina, com menos de 75% de células neoplásicas marcadas no TCB do tipo adenóide (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

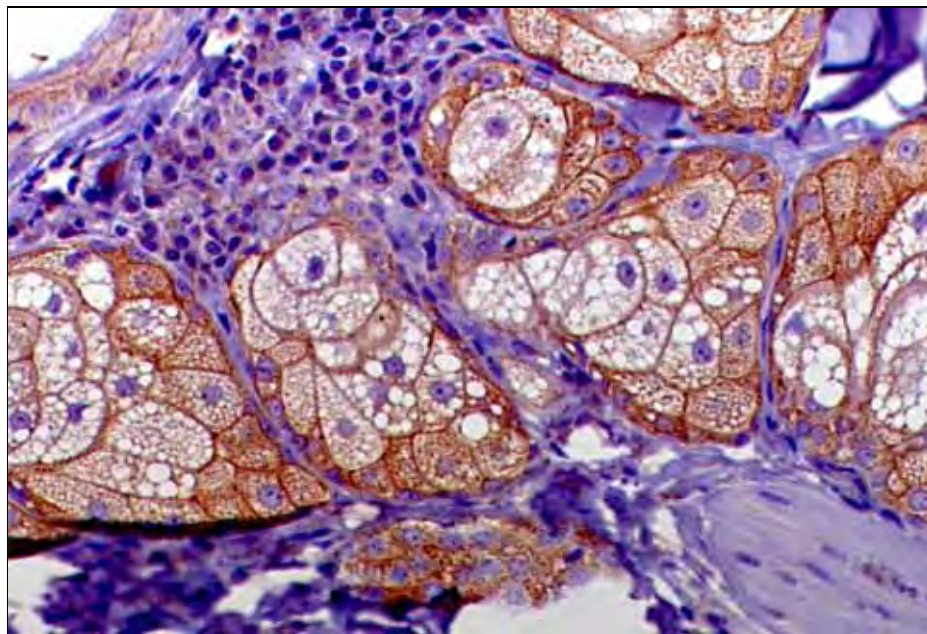


Figura 8- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um CCEQ. Observar a marcação intensa pelo anticorpo anti-E-caderina nas glândulas sebáceas, que serviram como controle positivo no próprio corte. (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

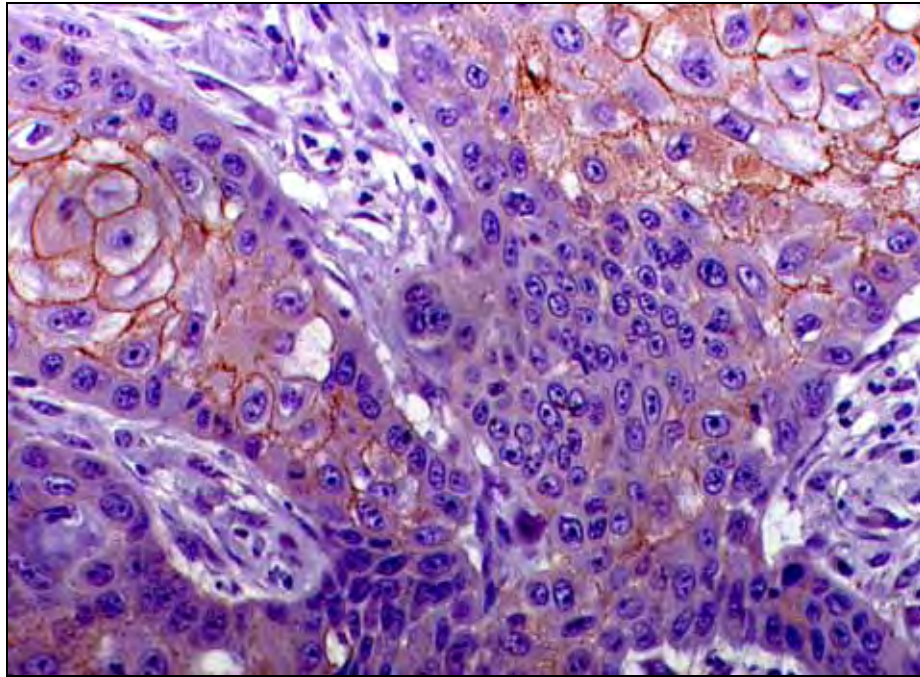


Figura 9- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo com diferentes tipos de marcação pelo anticorpo anti E-caderina das células neoplásicas, onde as células mais diferenciadas apresentaram coloração mais intensa.CCEQ (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

5.3- Expressão do VEGF

Considerando como expressão positiva do VEGF tumores com uma porcentagem de células marcadas maiores do que 25% e negativa, porcentagens menores que esta; 14 (70%) amostras de CCE e cinco (33,33%) de TCB mostraram expressão positiva. A expressão foi negativa em seis (30%) dos CCE e em 10 (66,67%) dos TCB. Houve diferença significativa ($P=0,0287$) na expressão do VEGF entre os tumores (Tabela 5). Os dados de expressão do VEGF estão expostos na Figura 10. Exemplos de marcação positiva, negativa e controle positivo do VEGF estão representados na Figuras de 11 a 13.

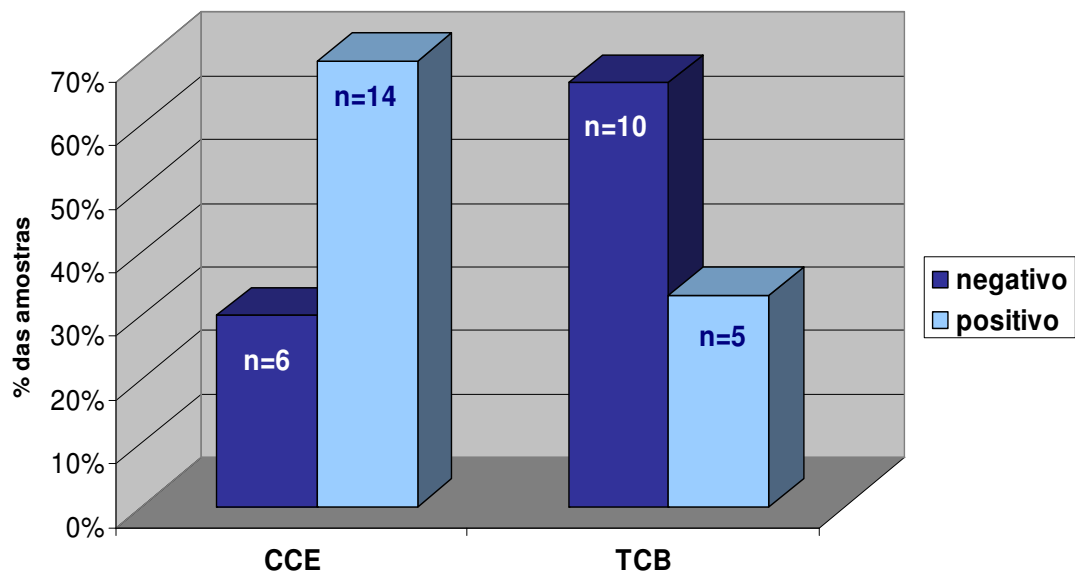


Figura 10- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE e de TCB mostrando a expressão positiva e negativa do VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

Tabela 5- Comparação pelo teste de Fisher da expressão do VEGF no CCE e no TCB.

		negativo	positivo	total
CCE	freqüência	6	14	20
	expectativa	9,1429	10,857	
	porcentagem	17,14	40,00	57,14
TCB	freqüência	10	5	15
	expectativa	6,8571	8,1429	
	porcentagem	28,57	14,29	42,86
Total	freqüência	16	19	35
	porcentagem	45,71	54,29	100

$P = 0,0287(p<0,05)$

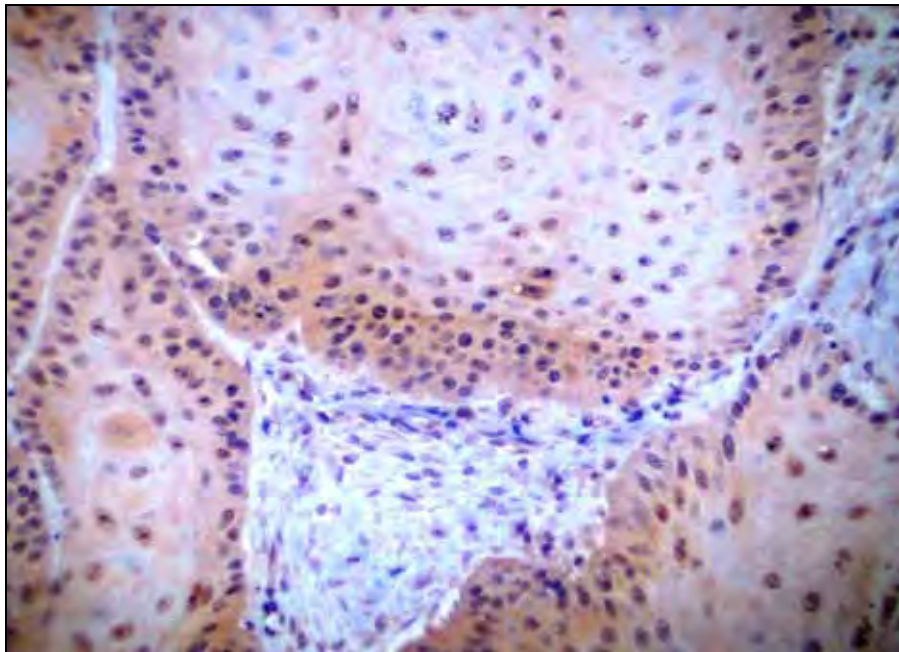


Figura 11- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão positiva para o VEGF, com mais de 25% de células neoplásicas marcadas com coloração intensa no CCE queratinizado (x100). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

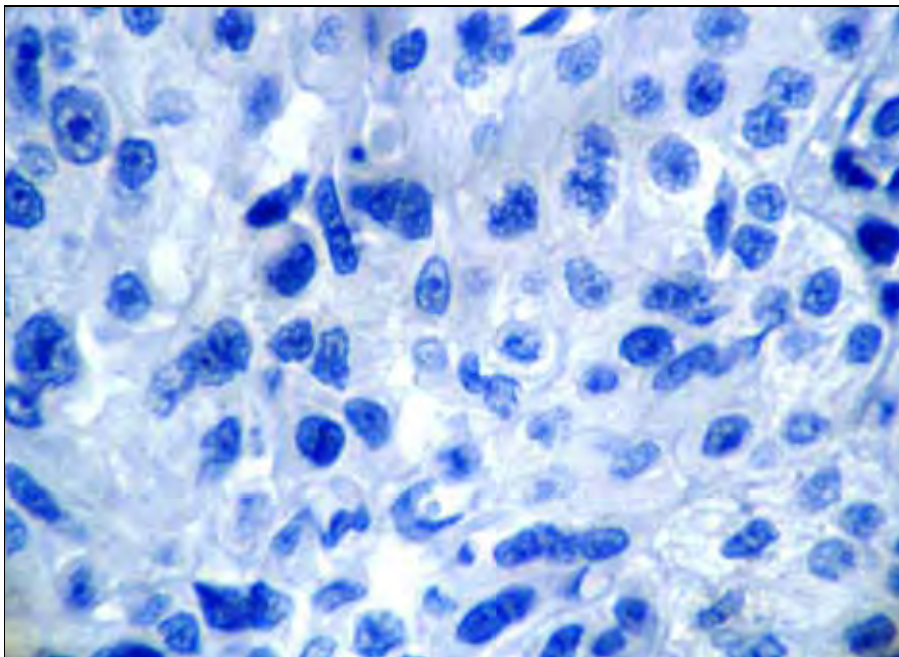


Figura 12- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica mostrando um campo considerado de expressão negativa para o VEGF no CCE queratinizado (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

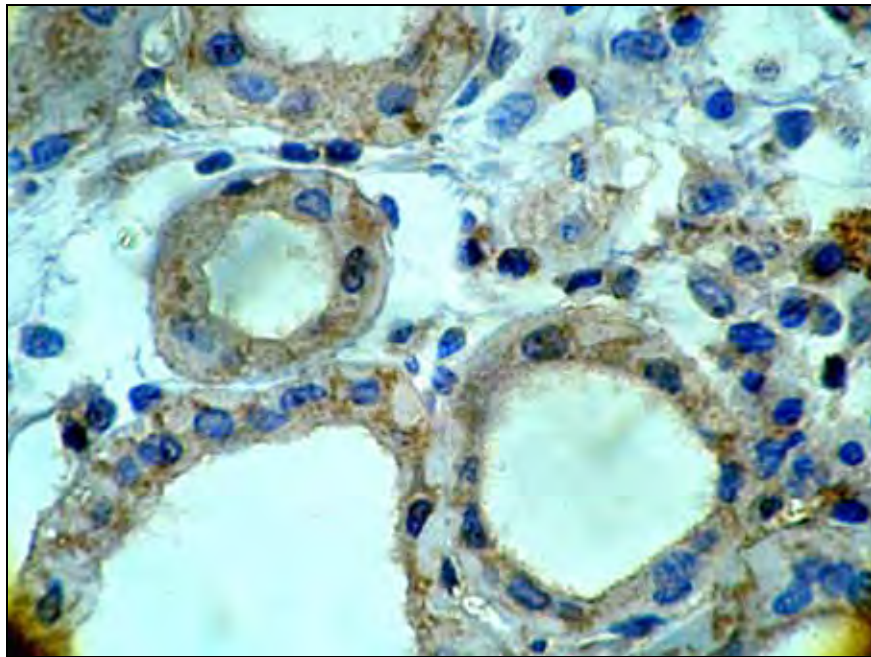


Figura 13- Fotomicrografia de preparação imunoistoquímica de um CCEQ. Observar a marcação intensa pelo anticorpo VEGF nas células endoteliais, que serviram como controle positivo no próprio corte. (x400). (método ABC, contracorado pela hematoxilina de Harris) UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

5.4- Correlação entre a E-caderina e o VEGF no CCE

No CCE verificou-se correlação de Spearman significativa de 0,4 ($p < 0,05$) entre os grupos E-caderina e VEGF (Tabela 6). Este resultado foi alcançado em função de uma maior quantidade de valores concordantes em relação aos discordantes. Os valores concordantes são aqueles negativos para E-caderina e positivos para o VEGF. Isto significa que no CCE, maior número de amostras apresentou expressão reduzida da E-caderina e positiva para o VEGF (Tabela 8 e Figura 14).

Tabela 6- Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina e do VEGF no CCE.

		reduzido / negativo	normal / positivo	total
E-caderina	freqüência	14	6	20
	expectativa	10	10	
	porcentagem	35,00	15,00	50,00
VEGF	freqüência	6	14	20
	expectativa	10	10	
	porcentagem	15,00	35,00	50,00
Total	freqüência	20	20	40
	porcentagem	50,00	50,00	100,00

$P = 0,0109$ ($p < 0,05$)

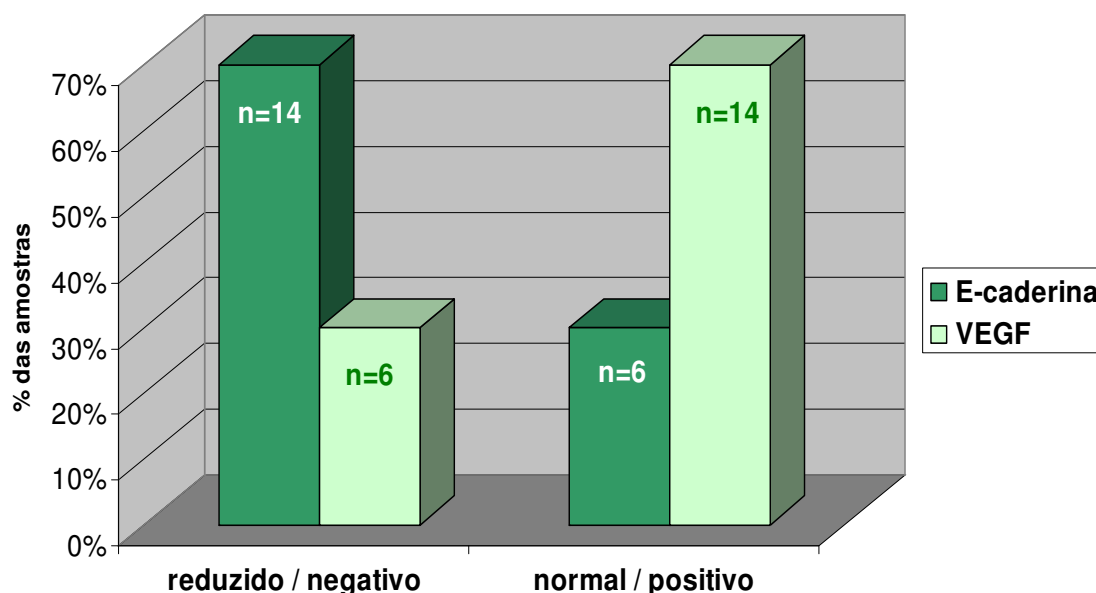


Figura 14- Representação gráfica da porcentagem de amostras de CCE comparando a expressão normal/positiva e reduzida/negativa das moléculas E-caderina e VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

5.5- Correlação entre a E-caderina e o VEGF no TCB

No TCB verificou-se a correlação de Spearman significativa de -0,47 ($p < 0,05$) entre os grupos E-caderina e VEGF (Tabela 7). Este resultado foi alcançado em função de um menor número de valores concordantes em relação aos discordantes. Os valores concordantes são aqueles negativos para a E-caderina e positivos para o VEGF. No TCB, o maior número de amostras apresentou expressão normal para a E-caderina e negativa para o VEGF e o menor número, expressão reduzida para E-caderina e positiva para o VEGF (Tabela 8 e Figura 15).

Tabela 7- Comparação pelo teste de Fisher da expressão da E-caderina e do VEGF no TCB.

		reduzido / negativo	normal / positivo	total
E-caderina	freqüência	3	12	15
	expectativa	6,5	8,5	
	porcentagem	10,00	40,00	50,00
VEGF	freqüência	10	5	15
	expectativa	6,5	8,5	
	porcentagem	33,33	16,67	50,00
Total	freqüência	13	17	30
	porcentagem	43,33	56,67	100,00

$P = 0,0114$ ($p < 0,05$)

Tabela 8- Número e porcentagem de amostras do CCE e do TCB que apresentaram expressão reduzida/negativa e normal/positiva das moléculas E-caderina e VEGF.

tumor	anticorpo	reduzido / negativo	normal / positivo	total
CCE	E-caderina	14 (70%)	6 (30%)	20 (100%)
	VEGF	6 (30%)	14 (70%)	20 (100%)
TCB	E-caderina	3 (20%)	12 (80%)	15 (100%)
	VEGF	10 (66,67%)	5 (33,33%)	15 (100%)

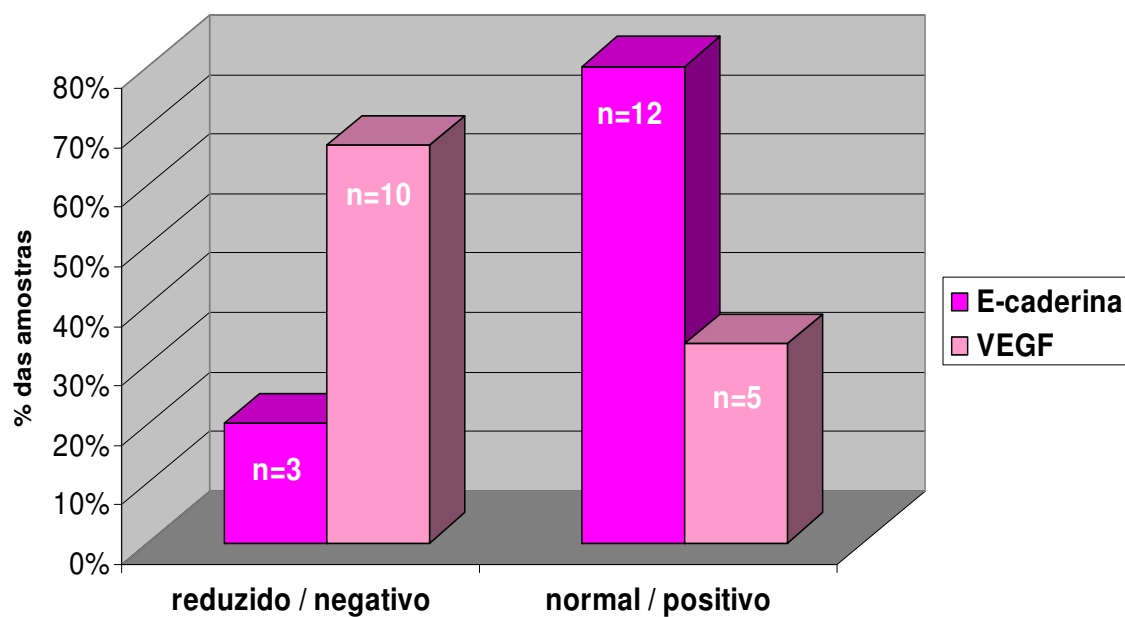


Figura 15- Representação gráfica da porcentagem de amostras de TCB comparando a expressão normal/positiva e reduzida/negativa das moléculas E-caderina e VEGF. UNESP – Jaboticabal, SP, 2007.

6- DISCUSSÃO

O CCE e o TCB são neoplasias epiteliais que apresentam alta incidência entre os cães. Neste estudo, os cães mais afetados pelo CCE foram os sem raça definida (SRD), seguidos pelos boxers, embora a literatura cite esta última como a mais predisposta (SCOTT et al., 1996; THOMAS & FOX, 1998). No caso dos TCBs, os poodles, seguidos pelos pastores alemães foram os mais acometidos, condizente com o referido na literatura (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996; THOMAS & FOX, 1998).

A média de idade dos cães com CCE foi de 7,45 anos e com TCB de sete anos, ambas dentro da faixa etária citada como a de maior incidência (THOMAS & FOX, 1998). Em ambos os tumores, a proporção entre machos e fêmeas foi semelhante, discordante do que sugerem Pulley & Stannard (1990), que citam os machos como mais predispostos para o TBC; e concordante com outros autores que não observaram predisposição sexual (SCOTT et al., 1996; VAIL & WITHROW, 1996).

Muito embora sejam citadas predisposições para o desenvolvimento de tumores relacionadas à raça, idade e sexo dos animais, vários fatores ambientais e características individuais estão envolvidos na etiologia desses tumores. Um dos principais fatores é a luz solar; animais que ficam expostos ao sol por tempo prolongado têm maior predisposição de apresentarem um tumor epitelial induzido pelos raios ultravioleta (SCOTT et al., 1996). Dados sobre os animais, como cor da pele, comprimento de pêlos, hábitos, alimentação, entre outros, são necessários para se estabelecer alguma relação entre o tipo tumoral e uma possível etiologia. Contudo, não há essas informações sobre os cães portadores dos tumores empregados neste estudo. Por se tratar de um estudo realizado com material arquivado, a possibilidade de se investigar esses dados torna-se impossível, o que impede o estabelecimento de qualquer comparação.

A expressão da E-caderina nos tumores caninos ainda não está bem estabelecida. Vários estudos mostram que a redução de sua expressão em tumores epiteliais humanos (SCHIPPER, 1991; FURUKAWA et al., 1997) e tumores mamários caninos (RESTUCCI et al., 2002; MATOS et al., 2006) está relacionada com o poder invasivo e metastático desses tumores.

Neste estudo, o grupo de CCE mostrou redução da expressão em 70% dos casos, ao passo que no TCB, 20% desses mostraram redução e 80% tiveram preservada a expressão da E-caderina. Em cães, não foram encontrados estudos prévios dessa molécula em tumores cutâneos epiteliais. Brunetti e colaboradores (2005) correlacionaram a diminuição da expressão da E-caderina em tumores mamários caninos com o aumento do seu poder de invasão, concordante com o estudo de Matos et al. (2006). No qual, os pesquisadores verificaram que todos os carcinomas mamários de maior malignidade apresentaram redução significativa da expressão de E-caderina, enquanto que todos os carcinomas com menor grau de malignidade apresentaram expressão normal dessa molécula. Estes autores relacionaram a redução de expressão com aumento de tamanho, presença de ulceração, metástases em linfonodos, necrose e comportamento infiltrativo do tumor, sem contudo associarem ao grau histológico. Piekarz (2007) também correlaciona em tumores mamários caninos de maior grau de malignidade a diminuição da expressão de E-caderina, concordando com o presente estudo em tumores cutâneos epiteliais. Embora os trabalhos mencionados não tenham sido conduzidos com tumores cutâneos epiteliais, pôde-se depreender com eles que tumores mais agressivos, em comparação a tumores menos agressivos, apresentam diferentes expressões de E-caderina. Essas referências corroboram com as encontradas nesse trabalho e reforçam o postulado de que os CCEs são de comportamento mais agressivo que os TBCs.

Em função do pequeno número de amostras de CCE não queratinizado e aos diferentes tipos de TCB (sólido, adenóide e medusóide) deste estudo, não foi possível relacionar o grau histológico dos tumores com as diferentes expressões. Apesar disso, foi algumas vezes observado que numa mesma amostra, em que havia diferentes graus de diferenciação celular, o padrão de expressão diferia. Células mais

diferenciadas apresentavam marcação com coloração mais intensa que células menos diferenciadas, o que sugere que a expressão da E-caderina possa estar relacionada com o grau histológico desses tumores cutâneos epiteliais (Figura 9).

Os resultados deste estudo se assemelham aos do estudo de Tada e colaboradores (1996), que relatam nos TCBs humanos preservada expressão de E-caderina e em todos os CCEs, expressão reduzida.

A E-caderina é uma molécula de adesão celular responsável pela manutenção da integridade do tecido. É também responsável por suprimir a habilidade de invasão das células tumorais (BEHRENS et al., 1989; NAVARRO et al., 1991; BIRCHMEIER et al., 1993). Sendo assim, a perda dessa molécula no tecido neoplásico poderia interferir diretamente na liberação de células tumorais, aumentando o poder de invasão e a chance de formação de metástases.

Neste estudo, o grupo de CCE apresentou redução da expressão na maioria das amostras (70%), em comparação com o TCB (20%), onde na maioria a expressão estava preservada. Estes resultados vão de encontro ao citado anteriormente sobre o comportamento biológico desses tumores.

O VEGF é um importante indutor da angiogênese, além de produzir colagenase e outras enzimas degradativas que facilitam a saída da célula neoplásica para a circulação (MOSCATELLI et al., 1981). Ele também estimula o crescimento das células tumorais (WEIDNER, 1998). é um potente mitógeno e o aumento de sua expressão tem correlação direta com o aumento da angiogênese tumoral (CRESSEY et al., 2005). Neste estudo, a expressão do VEGF estava presente na maioria das amostras de CCEs e na minoria de TCBs. Em estudo semelhante, Maiolino et al. (2000) observaram que 100% (15) das amostras de CCE apresentaram marcação do VEGF, enquanto no TCB em apenas 15% (3) das amostras foram marcadas. Os autores acrescentaram ainda que somente os TCBs do tipo sólido expressaram o VEGF, diferentemente deste estudo, em que não se registrou padrões de marcação diferenciados entre os grupos de TCB.

Concordantes com o presente estudo, em humanos também foi observada expressão aumentada de VEGF em todos os CCE, e ausente ou leve nos TCBs (WENINGER et al., 1996). Outros autores (UEHARA et al., 2004; KYZAS et al, 2005) correlacionam a expressão do VEGF no CCE a pacientes com pior prognóstico, enquanto pacientes com melhor prognóstico, foram aqueles que o tumor não apresentava a expressão dessa molécula. O aumento da expressão no grupo dos CCE é condizente com o comportamento mais agressivo desse tumor, quando comparado com o grupo de TCB.

Também em um estudo de Restucci et al. (2003) foi observado aumento da expressão de VEGF e da microvasculatura em seminomas caninos, quando comparados a testículos normais. Entretanto, não houve correlação estatística entre a expressão do VEGF e o aumento da microvasculatura. Yonemaru e colaboradores (2006) compararam a expressão do VEGF nos tumores hemangiossarcoma e hemangioma, sendo que os hemangiossarcomas apresentaram expressão forte do VEGF na maioria das amostras, diferente do hemangioma. Estes autores relacionaram a expressão do VEGF com o comportamento maligno e invasivo do tumor. Concordante com o presente trabalho, estes autores também relacionaram a expressão do VEGF com o comportamento biológico dos tumores.

As células tumorais necessitam de nutrientes e oxigênio para se manterem vivas e proliferarem. Sendo assim, a angiogênese parece ser essencial para contribuir com o poder invasivo e metastático de tumores (FOLKMAN, 1990). O VEGF estando diretamente envolvido na angiogênese pode ser muito útil como marcador de prognóstico em pacientes portadores de tumor, além de ser um possível alvo de terapias.

Quando se correlaciona a expressão da E-caderina com a do VEGF dentro de cada grupo de tumor, se observa que os padrões de expressão são inversos. No CCE, há uma menor expressão da E-caderina e uma maior expressão do VEGF, enquanto no TCB acontece o oposto, há uma maior expressão de E-caderina e menor do VEGF. Esta correlação reforça a hipótese de que podemos usar estas duas moléculas como marcadores de prognóstico. Apesar de não se conhecer o prognóstico

desses animais (pois não houve acompanhamento dos pacientes) baseado nos resultados deste estudo, associado ao postulado sobre o comportamento mais agressivo, com maior poder de invasão e maior chance de formação de metástases do CCE, pode-se inferir a importância dessas moléculas na definição de um prognóstico.

7- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

1. O perfil dos cães deste estudo acometidos pelo CCE e pelo TCB se assemelha aos descritos na literatura para parâmetros como raça, idade e sexo predispostos.
2. O padrão da expressão dos anticorpos nos dois tipos de tumores cutâneos epiteliais (CCE e TCB) estudados condiz com o comportamento mais agressivo do CCE em comparação com o TCB.
3. A expressão do VEGF e da E-caderina nos CCEs e nos TCBs são úteis em estabelecer o prognóstico em cães.

8- REFERÊNCIAS ¹

BANKFALVI, A. et al. Deranged expression of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 31, p. 450-457, 2002.

BEHERENS, J. et al. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 108, p.2435-2447, 1989.

BIRCHMEIER et al. Molecular mechanisms leading to cell junction (cadherin) deficiency in invasive carcinomas. **Semi. Cancer Biol.**, v. 4, p. 231-239, 1993.

BRUNETTI, B. et al. E-Cadherin and β -catenin reduction influence invasion but not proliferation and survival in canine malignant mammary tumors. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 42, p. 781-787, 2005.

COHEN, M.B. et al. Cellular adhesion molecules in urologic malignancies. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 107, p. 56, 1997.

CRESSEY, R. et al. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumorigenesis. **BMC Cancer**, v. 5, p. 128, 2005.

DENTON, K.J. et al. A study of adhesion molecules as markers of progression in malignant melanoma. **J Pathol.**, Sussex, v.167, n. 2, p. 187-191, 1992.

¹ Normas da ABNT-NR6023 (agosto de 2002)

DVORAK, H.F. et al. Vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.146, p. 1029-1039, 1995.

ELANGBAM, C.S.; QUALLS, C.W.; DAHLGREN, R.R. Cell adhesion molecules-Update. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 34, p. 61-73, 1997.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. Nat. Cancer Inst.** v. 82, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FOTY, R.A.; STEINBERG, M.S. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 48, p. 397-409, 2004.

FUJITA, M. et al. Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development: morphogenesis of epidermis, hair follicles and sweat ducts. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 284, p. 159-166, 1992.

FURUKAWA, F et al. Cadherins in cutaneous biology. **J. Dermatol.**, Tokyo, v. 21, p. 802-813, 1994.

FURUKAWA, F et al. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. **Microscopy Res. Technique**, New York, v. 38, p. 343-352, 1997.

GARCIA, A.S. et al. E-cadherin, laminin and collagen IV expression in the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Saint Louis, v. 11, p. E100-105, 2006.

GOODSELL, D.S. The molecular perspective: cadherin. **Stem Cells**, Durham, v. 20, p. 583-584, 2002.

HIRAI, Y et al. Expression and role E-and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II skin morphogenesis. **Development**, Cambridge, v. 105, p. 271-277, 1989.

HORIGUCHI, Y. et al. Ultrastructural localization of E-cadherin cell adhesion molecule on the cytoplasmic membrane of keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 42, p. 1333-1340, 1994.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 75, p. 734-738, 1981.

JAWHARI, A. et al. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 112, p. 46-54, 1997.

KYZAS et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 11, p. 1434-1440, 2005.

LEUNG, D. W. et al. Vascular endothelial growth factor as a secreted angiogenic mitogen. **Science**, Washington, v. 246, p. 1306-1309, 1989.

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

MATOS, A. J. F. et al. E-cadherin expression in canine malignant mammary tumours: relationship to other clinico-pathological variables. **J. Comp. Pathol.**, Edinburgh, v. 134, p. 182-189, 2006.

MOLL, R. et al. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, Edinburgh, v. 143, p. 1731-1742, 1993.

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

NAVARRO, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 115, p. 517-533, 1991.

OKEGAWA, T.; PONG, R.C.; LI, Y.; HSIEH, J. T. The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy. **Acta Biochim. Pol.**, Warszawa, v. 51, p. 445-457, 2004.

OZAWA, M.; KEMLER, R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-cadherin.catenin complex. **J Biol. Chem.**, Bethesda, v. 273, p. 6166-6170, 1998.

PAREDES, A. G. J. et al. P-cadherin expression in canine mammary tissues. **J. Comp. Path.**, Edinburgh, v. 130, p. 13-20, 2004.

PIEKARZ, H.C. Expressão da E-caderina no prognóstico de neoplasias mamárias em cadelas. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PIZARRO, A. et al. E-cadherin expression in basal cell carcinoma. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v. 69, p. 157-162, 1994.

PLATT, S. R. et al. Vascular endothelial growth factor expression in canine intracranial meningiomas and association with patient survival. **J. Vet. Intern. Med.**, Lawrence, v. 20, n. 3, p. 663-668, 2006.

PULLEY, T.; STANNARD, A. A. Tumour of the skin and soft tissues. In: MOULTON, J. E. **Tumors in domestic animals**. 3. ed. Los Angeles: Library of Congress 1990. p. 56-61.

RESTUCCI, B. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. **Vet. Pathol.**, Washington, v. 39, p. 488-493, 2002.

RESTUCCI, B. et al. Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. **J. Comp. Path.**, Edinburgh, Edinburgh, v. 128, p.252-259, 2003.

RESTUCCI, B. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumors. **J. Comp. Path.**, Edinburgh, v. 130, p. 99-104, 2004.

RICHMOND, P. J. et al. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 57, p. 3189-3193, 1997.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de pequenos animais**. 5. ed. Rio de Janeiro. Interlivros: 1996. p. 448-451.

SCHIPPER, J. H. E-cadherin expression in squamous cell carcinoma of head and neck: inverse correlation with tumour dedifferentiation and lymph node metastasis. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 51, p. 6328-6337, 1991.

SEMB, H.; CHRISTOFORI, G. The tumor-suppressor function of E-cadherin. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 63, p. 1588-1593, 1998.

SHIRAHAMA, S. et al. E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer. **J. Dermatol. Sci.**, v. 13, p. 30-36, 1996.

SIITONEN, S. M. et al. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavourable prognosis in breast cancer. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 105, p. 394-402, 1996.

SYRIGOS, K.N. et al. E-cadherin expression in bladder cancer using formalin fixed paraffin imbedded tissues: correlation with histopathological grade, tumor stage and survival. **Int. J. Cancer**, New York, v. 64, p. 367-70, 1995.

TADA, H. et al. Expression of E-cadherin in skin carcinomas. **J. Dermatol.**, Tokyo, v. 23, p. 104, 1996.

TAKAHASHI, Y. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR correlates with vascularity, metastasis and proliferation of human colon cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55, p. 3964-3968, 1995.

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

UEHARA, M. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and prognosis of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. Oxford , v. 40, p. 321-325, 2004.

VAIL, M. D.; WITHROW, S .J. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 2 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996. p. 173-176.

WEIDNER, N. Tumoral vascularity as a prognostic factor in a cancer patients: the evidence continues to grow. **J. Pathol.**, Sussex, v. 184, p. 119-122, 1998.

WENINGER et al. Vascular endothelial growth factor production I normal epidermis and benign and malignant epithelial skin tumours. **Laboratory Investigation**, Hagerstown, v. 75, p. 647-657, 1996.

WITZ, I. P. The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v. 104, p. 89-93, 2006.

YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. Skin and appendages. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N., **Pathology of domestic animals** 3 ed. New York: Academic Press, 1985. p. 509-511.

YONEMARU et al. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and their receptors (Flt-1, Flk-1 and Flg-1) in canine vascular tumours. **Vet. Pathol.**, Sussex, v. 43, p. 971-980, 2006.

ZAUGG, N. et al. Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and *in situ* squamous cell carcinoma. **Vet. Dermatol.**, Oxford, v. 16, p. 290-298, 2005.