UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DA CICLOXIGENASE-2 COMO PARÂMETROS PROGNÓSTICOS NA CERATOSE ACTÍNICA E NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES

Sabrina dos Santos Costa
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DA CICLOXIGENASE-2 COMO PARÂMETROS PROGNÓSTICOS NA CERATOSE ACTÍNICA E NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES

Sabrina dos Santos Costa

Orientador: Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SABRINA DOS SANTOS COSTA – nascida em 13 de abril de 1981, em Brasília-DF, filha de Maria Antônia Santos Costa e Marvio dos Santos Costa. Em 2004 concluiu o curso de graduação em Medicina Veterinária pela Escola de Veterinária, na Universidade Federal de Goiás. Realizou o Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Clínica Médica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel", na Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, de 01 de fevereiro de 2005 a 31 de janeiro de 2007, sob orientação da Profª. Drª. Marileda Bonafim Carvalho. Aluna regular do curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV, na UNESP, Câmpus de Jaboticabal desde março de 2007, sob orientação do Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho e colocar pessoas boas em minha vida.

Ao Prof. Dr. Mário Roberto Hatayde, meu orientador, que se tornou uma pessoa tão especial ao final destes 2 anos. Agradeço pelo apoio, dedicação e curiosidade neste trabalho, pela amizade, conversas e ensinamentos na vida científica e pessoal. Minha gratidão, admiração, respeito e carinho.

À Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa. Alguém para se espelhar. Agradeço a amizade, os ensinamentos, o incentivo, o auxílio e a disponibilidade constantes, e pelas correções sugeridas durante o Exame de Qualificação e Defesa.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck, pela amizade, convívio, oportunidades e auxílio na obtenção de material, e correções sugeridas durante o Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, pela generosidade e carinho com que me recebeu na FMVZ/UNESP. Muito obrigada por me proporcionar dias de trabalho tão agradáveis em Botucatu e por ser uma pessoa tão positiva, incentivadora e acolhedora.

Ao Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi, pelas correções feitas durante a Defesa do trabalho, sempre com muito carinho e competência.

À Prof. Dr. José Carlos Barbosa pela disponibilidade e boa vontade durante a realização da avaliação estatística.

À Juliana Werner, por ter permitido o acesso ao arquivo de seu laboratório, pelo cuidado durante a seleção das amostras e boa vontade em colaborar com o trabalho.

Ao Rafael, pelos ensinamentos em dermatopatologia e amizade.

Aos médicos veterinários responsáveis pelo atendimento dos cães e aos proprietários, pelo fornecimento das informações e fotos.

Aos funcionários Antônio Carlos Pugliesi, pelo auxílio na contenção dos cães durante a coleta das biópsias.

À funcionária Lia, pelo processamento das amostras e montagem das lâminas.

À funcionária Lígia Guadanhim, pela amizade, pela torcida, pelo carinho e pelo ótimo convívio.

À minha mãe Maria Antônia, pelo amor incondicional, alegrias, piadas e por me fazer perceber o quão forte podemos ser.

Ao meu pai Marvio, por toda dedicação e amor para que suas filhas possam ser felizes.

À minha irmã Juliana, por ser fonte inesgotável de amor, carinho, paz e estímulo. Ter você em minha vida me faz uma pessoa melhor. Obrigada por seguir comigo em busca de meus sonhos.

À minha irmã Nathalia, pela amizade, carinho, incentivo para que eu sempre seguisse em linha reta e ter me inspirado tanto a gostar do que fazemos. Amo muito você!
Ao Franco Metzker Poggiani, por ser a melhor pessoa que Deus poderia escolher para viver ao meu lado. Obrigada por trazer tantas alegrias para minha vida.

Ao melhor amigo do mundo, Thiago. Obrigada pela amizade, pelos anos de residência e mestrado de tanto companheirismo, risadas, choros, botecos, trabalho, festas e boa influência. Adoro você!

À república Paraíso: Bianca, Gláucia, Letícia, Lígia, Patrícia e Raquel. Obrigada pela ótima convivência, festas, conversas, almoços. Obrigada pelo nosso delicioso dia-a-dia e por serem um porto seguro.

À Sabrina Calazans, querida amiga que ganhei ao entrar na Oncologia. Vou agradecer sempre por você participar tanto da minha vida, em todos os sentidos. Obrigada pela amizade, bom humor, risadas, conversas intermináveis, paciência, ajuda ao ler meu material e é claro, pelos ensinamentos em Oncologia.

Aos queridos amigos da Oncologia, Carol, Érika, Georgia, Giovanny, Joice, Sabrina e Thiago, pela amizade e ótimos momentos de trabalho e descontração.

Aos bons frutos que o Hospital Veterinário me deu: Daniel Paulino, Fábio Nelson, Fernanda Medeiros, Gesiane, Jane, Luciane, Marcy, Mariana Miotto, Nicole, Sofia.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, por ter me acolhido.

À UNESP - Jaboticabal, por me proporcionar os 4 melhores anos da minha vida.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE ABREVIATURAS..... vii
LISTA DE FIGURAS..... viii
LISTA DE TABELAS..... x
RESUMO..... xi
ABSTRACT..... xii
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 2
3. OBJETIVOS..... 14
3.1. Objetivo Geral..... 14
3.2. Objetivos Específicos..... 14
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 15
4.1. Seleção das amostras..... 15
4.2. Exame histopatológico..... 16
4.3. Índice mitótico..... 16
4.4. Estudo imunoistoquímico..... 17
4.5. Avaliação clínica do prognóstico..... 19
4.6. Análise estatística..... 20
5. RESULTADOS..... 21
5.1. Exame histopatológico..... 21
5.2. Dados de freqüência..... 23
5.3. Índice mitótico..... 25
5.4. Estudo imunoistoquímico..... 26
5.4.1. Imunomarcação para COX-2..... 26
5.4.2. Imunomarcação para a proteína Ki-67 (MIB-1)..... 28
5.5 Correlação entre a imunomarcação para Ki-67 e COX-2 e as figuras de mitose.. 31
5.6. Avaliação clínica do prognóstico..... 31
6. DISCUSSÃO..... 33
7. CONCLUSÕES..... 42
8. REFERÊNCIAS..... 43
9. ANEXOS..... 54

LISTA DE ABREVIATURAS

CCE	CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
COX	CICLOXIGENASE
DAB	DIAMINOBENZIDINA
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
FCAV	FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
FGF	FATOR DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO
FMVZ	FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
G0	GRUPO CONTROLE
G1	GRUPO CERATOSE ACTÍNICA
G2	GRUPO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
H.E.	HEMATOXILINA-EOSINA
IM	ÍNDICE MITÓTICO
LED	LÚPUS ERITEMATOSO DISCÓIDE
NCAM	MOLÉCULA DE ADESÃO DE CÉLULA NEURAL
NF*k*B	FATOR NUCLEAR *k*B
nm	NANÔMETRO
p53	GENE P53
PG	PROSTAGLANDINA
SAS	STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM
UNESP	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
UV	RAIO ULTRAVIOLETA
UVB	RAIO ULTRAVIOLETA TIPO B
VEGF	FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

LISTA DE FIGURAS

		Páginas
FIGURA 1.	Ceratose actínica. A epiderme exibe hiperplasia irregular e com formação de cristas, e paraceratose compacta confluente. Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 2.	Ceratose actínica. Pleomorfismo celular, perda da polaridade dos ceratinócitos e desorganização das camadas da epiderme (*). Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 3.	CCE bem diferenciado. Hiperplasia irregular em epiderme.Proliferação neoplásica dos ceratinócitos e invasão da derme (*). Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 4.	CCE bem diferenciado. Ceratinócitos de tamanho aumentado e atipia nuclear. Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 5.	CCE acantolítico. Área de acantólise (*). Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 6.	CCE acantolítico. Notar perda das junções intercelulares (seta). Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.....	22
FIGURA 7.	Frequência de ceratose actínica e CCE cutâneo de acordo com a raça dos cães. Jaboticabal, 2009.....	24
FIGURA 8.	Frequência de ceratose actínica e CCE cutâneo de acordo com a idade dos cães. Jaboticabal, 2009.....	24
FIGURA 9.	Distribuição topográfica das lesões de ceratose actínica e CCE cutâneo. Jaboticabal, 2009.....	24
FIGURA 10.	Ceratose actínica. Eritema, alopecia e crostas em região abdominal ventral. Jaboticabal, 2009.....	27

Páginas

FIGURA 11. Ceratose actínica. Foliculite bacteriana superficial em região abdominal ventral (setas). Jaboticabal, 2009..... 27

FIGURA 12. Ceratose actínica. Comedões actínicos em região abdominal ventral (setas). Jaboticabal, 2009..... 27

FIGURA 13. Ceratose actínica. Erosão, alopecia, eritema e exsudação em membro pélvico direito. Curitiba, 2009. 27

FIGURA 14. CCE cutâneo. Lesão erosiva em tórax lateral. Brasília, 2009..... 27

FIGURA 15. CCE cutâneo. Lesão proliferativa em prepúcio. Curitiba, 2009..... 27

FIGURA 16. Ceratose actínica. Ceratinócitos fortemente marcados para COX-2 na epiderme (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009..... 30

FIGURA 17. CCE cutâneo. Ceratinócitos neoplásicos fortemente marcados para COX-2, invadindo a derme (*). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009..... 30

FIGURA 18. CCE cutâneo. Controle negativo para COX-2. Ausência de marcação. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009..... 30

FIGURA 19. Rim. Controle positivo para COX-2. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009..... 30

FIGURA 20. Ceratose actínica. Imunomarcação para Ki-67 em ceratinócitos (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009..... 30

FIGURA 21. CCE cutâneo. Imunomarcação para Ki-67 em ceratinócitos, invadindo a derme (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009. 30

LISTA DE TABELAS

Páginas

TABELA 1 - Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo na epiderme dos cães de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009..... 18

TABELA 2 - Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo na epiderme dos cães de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009..... 19

TABELA 3 - Valores individuais e médios referentes aos índices mitóticos encontrados em G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009..... 26

TABELA 4 - 4. Valores individuais e médios dos escores referentes à imunomarcação de COX-2 nas amostras de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009..... 28

TABELA 5 - Valores individuais e médios referentes à porcentagem de células positivas para a imunomarcação de Ki-67 (MIB-1) nas amostras de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009..... 29

TABELA 6 - Valores médios e resultados obtidos na análise de variância para a imunomarcação de Ki-67 e COX-2 em cães acometidos por ceratose actínica e por CCE cutâneo. Jaboticabal, 2009..... 31

PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DA CICLOXIGENASE-2 COMO PARÂMETROS PROGNÓSTICOS NA CERATOSE ACTÍNICA E NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES

RESUMO – Este estudo apresenta uma análise comparativa da taxa de proliferação celular e da expressão da enzima cicloxigenase-2 na pele de cães saudáveis e acometidos por ceratose actínica e carcinoma de células escamosas cutâneo (CCE). O objetivo foi avaliar o prognóstico destes cães utilizando-se a imunorreatividade a COX-2 e o índice de proliferação celular. Foram analisados 20 amostras de pele de cães, sendo 10 casos de ceratose actínica (G1) e 10 de CCE cutâneo (G2). Os dados epidemiológicos e as características clínicas e histopatológicas foram estudados. A taxa de proliferação celular foi avaliada por meio de índice mitótico (IM) e imunomarcação para MIB-1. A expressão da enzima cicloxigenase foi pesquisada por exame imunoistoquímico. Os cães da raça Pit Bull foram os mais acometidos em G1 e G2 e a média de idade foi 4,3 (±0,8) anos e 5,6 (±1,7) anos, respectivamente. Os valores médios do índice mitótico foram 0,4; 4,6 (±3,6) e 4,9 (±2,6) em G0, G1 e G2, respectivamente. Não houve diferença estatística entre G1 e G2, mas sim em relação ao G0. Houve imunomarcação para COX-2 em G1 e G2, a média dos escores foi 8,16 (±3,51) e 8,56 (±1,03), respectivamente. Não houve imunomarcação nas amostras de G0 e não houve diferença estatística entre G1 e G2, mas sim em relação ao G0 ($p>0,05$). A média da porcentagem de células imunomarcadas para Ki-67 em G0, G1 e G2 foi 0,4; 15,77 (± 8,81) e 17,71 (± 12,21), respectivamente. Não houve diferença entre G1 e G2, mas sim destes em relação ao G0 ($p>0,05$). A ceratose actínica se comportou como o CCE cutâneo, revelando não ser uma lesão pré-neoplásica, mas sim o estágio inicial da neoplasia propriamente dita.

Palavras-chave: ceratose actínica, carcinoma, cicloxigenase, proliferação, cão.

CELL PROLIFERATION AND CYCLOOXIGENASE-2 EXPRESSION AS PROGNOSTIC PARAMETERS IN ACTINIC KERATOSIS AND CUTANEOUS SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN DOGS

ABSTRACT – This research presents a comparative analysis of cell proliferation index and cyclooxigenase-2 expression in skin of healthy and with actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) dogs. The goal was to evaluate the prognosis of these dogs by COX-2 immunorreactivity and cell proliferation index. Skin sections from 20 dogs were evaluated, which 10 were actinic keratosis (G1) and 10 cutaneous SCC (G2). Epidemiological information, clinical and histopathological aspects were evaluated. Cell proliferation index hás been stimated by mitotic index (MI) and MIB-1 staining. Cyclooxigenase-2 expression has been analyzed by immunohistochemistry study. Pit Bull dogs were the main affected in G1 and G2 and the mean age was 4,3 (±0,8) years old and 5,6 (±1,7) years old, relatively. MI mean values were 0,4; 4,6 (±3,6) and 4,9 (±2,6) in G0, G1 and G2, relatively. There was no statistical difference between G1 and G2, but it did with G0. There was positive staining for COX-2 in G1 and G2, the score mean value was 8,16 (±3,51) and 8,56 (±1,03), relatively. There was no positive staining in G0 samples and neither statistical difference between G1 and G2, but it did with G0 ($p>0,05$). The positive cells for Ki-67 mean percentage in G0, G1 and G2 was 0,4; 15,77 (± 8,81) and 17,71 (± 12,21), relatively. There was no difference between G1 and G2, but it did with G0 ($p>0,05$). Actinic keratosis behavior was similar to cutaneous SSC, demonstrating that it is not a pre-neoplastic disease, but, in fact, the initial of neoplasm.

Key words: actinic keratosis, carcinoma, cyclooxigenase, proliferation, dog.

1. INTRODUÇÃO

A exposição excessiva à radiação solar pode trazer sérios danos à pele, sendo o mais grave deles, o câncer de pele. É aceito que a depleção contínua da camada de ozônio tem efeito no ambiente e na saúde humana e o aumento da radiação ultravioleta (UV) que atinge o homem é também potencialmente perigoso para os animais. Entre as doenças que parecem aumentar entre os animais em razão da continuada perda de ozônio atmosférico destacam-se a ceratose actínica e o carcinoma de células escamosas (CCE) cutâneo.

As dermatopatias provocadas pela exposição à radiação solar têm sido muito pesquisadas em medicina humana, entretanto, o mesmo não ocorre de maneira proporcional em medicina veterinária. Embora conte com o pelame como fator de proteção à incidência de raios solares, a espécie canina enfrenta exposição prolongada a eles, principalmente em virtude do clima tropical encontrado na maior parte do Brasil. Tal situação resulta no desenvolvimento precoce de dermatopatias, quer sejam de origem neoplásica ou não.

Tendo em vista os já conhecidos danos causados pela exposição excessiva ao sol e sabendo-se que a carcinogênese cutânea sofre ação de fatores genéticos e ambientais, estudou-se a taxa de proliferação celular e a expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) na pele de cães acometidos por ceratose actínica e por CCE cutâneo. O intuito foi pesquisar o comportamento biológico da dermatose solar em questão, considerada uma lesão pré-neoplásica e que apresenta diversas similaridades com o CCE cutâneo em termos clínicos e histológicos.

A imunomarcação para a proteína Ki-67 (MIB-1) e para COX-2 pode auxiliar no melhor entendimento da progressão da lesão pré-neoplásica (ceratose actínica) à neoplasia maligna (CCE), bem como da correlação de níveis aumentados de COX-2 com o estímulo à proliferação celular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A radiação solar está envolvida na patogênese da ceratose actínica e do CCE em cães (SCOTT et al., 2001). Estudos epidemiológicos em humanos demonstraram que a exposição prolongada à luz UV resulta em aumento na incidência de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas na pele (BERMAN et al., 2006; ULRICH et al., 2007).

A luz UV do tipo A possui ondas com comprimento entre 320 e 400nm, penetra em maior profundidade na pele do que a UV do tipo B e está associada a reações de fotossensibilidade. A luz UVB possui ondas com comprimento entre 290 e 320nm e geralmente é associada a queimaduras solares ou eritema. A luz UV do tipo C tem ondas de comprimento inferior a 290nm e é prejudicial à pele, mas geralmente não atinge a superfície terrestre devido à barreira representada pela camada de ozônio (SCOTT et al., 2001).

A pele que sofre dano solar pode exibir elastose solar dérmica e aglomeração nuclear, mas com discreta anormalidade nuclear e espessamento da epiderme (BERMAN et al., 2006). Em 1896, UNNA observou uma forte coloração do tecido elástico e aparência azulada típica na derme exposta ao sol, definindo estas alterações como degeneração basofílica. Desde então, as alterações elastóticas na pele são consideradas o principal indicador de exposição solar cumulativa na derme (KLIGMAN & SAYRE, 1991).

A ceratose actínica é uma doença bem documentada no homem (ORTONNE, 2002; COCKERELL, 2003; LEBWOHL, 2003) e que também acomete cães (HARGIS et al., 1977; PAPADOGIANNAKIS et al., 2008) e gatos (FAVROT et al., 2009). As lesões são observadas em áreas cronicamente expostas ao sol e na maioria dos casos ocorrem em regiões menos pigmentadas e com poucos pêlos, como abdômen ventral e lateral e flanco (GROSS et al., 2005). Os cães das raças Dálmata, American Staffordshire Terrier, Beagle, Basset Hound e Bull Terrier apresentam predisposição a lesões actínicas (SCOTT et al., 2001). As lesões ocorrem principalmente em cães mais velhos, mas a doença também foi observada em idade inferior a dois anos (GROSS et al., 2005).

O principal fator etiológico é a excessiva exposição à luz UV. Logo, a ceratose actínica é mais comum em países de latitude baixa, onde a exposição à luz UVB pode ser o dobro da que ocorre em latitudes mais altas (LEBWOHL, 2003). Além da latitude, RIGEL et al. (1999) demonstraram que a intensidade da luz UVB aumenta 8-10% por 304 metros de altitude.

A exposição da pele à luz UV provoca conseqüências imunológicas locais e sistêmicas. A exposição à luz UVA ou UVB altera as funções e características morfológicas das células de Langerhans, além de influenciar a produção de citocinas na pele. O reconhecimento e processamento prejudicado de antígenos e uma resposta imune deficiente podem influenciar a susceptibilidade a neoplasias e infecções cutâneas (SCOTT et al., 2001).

O estresse fotooxidativo provocado por raios UVA indiretamente causa mutações características no DNA (ácido desoxirribonucléico). Por outro lado, a radiação UVB age diretamente na formação de dímero de timina e transições C→T OU CC→TT no DNA e RNA. A ausência de mecanismos adequados de reparação nestas alterações no DNA representa o início das mutações nos ceratinócitos que podem progredir no desenvolvimento da ceratose actínica (STOCKFLETH & KERL, 2006).

A exposição iatrogênica repetida à luz UVA em combinação ou não com psoralenos, raios-X ou radioisótopos também é considerada agente causal. Além disso, o papilomavírus atua como co-carcinógeno na etiopatogenia da ceratose actínica em humanos (STOCKFLETH & KERL, 2006) e estimula a proliferação epitelial em várias espécies animais (MUNDAY et al., 2007). Em humanos, existem outros fatores de risco, como por exemplo, dieta rica em gordura (LEBWOHL, 2003), imunossupressão crônica, exposição a arsênico e inflamação cutânea crônica (ULRICH et al., 2007).

Em cães, o aspecto clínico é extremamente variável. As lesões iniciais caracterizam-se por placas eritematosas e espessas e são encontradas principalmente em abdômen ventral, flanco e parte medial de membros pélvicos. Em decorrência da cronicidade, as lesões variam de eritema focal com crostas e descamação, pápulas e máculas mal definidas, a placas e nódulos ceratóticos, endurecidos, com crostas escurecidas. Erosões e úlceras com crostas hemorrágicas podem ocorrer. Piodermite

secundária com furunculose actínica são achados comuns e são oriundos de comedões actínicos. No cão, o diagnóstico diferencial clínico de lesões infiltrativas, profundas e severas incluem foliculite e furunculose bacteriana profunda e CCE (GROSS et al., 2005).

Um dos maiores desafios no diagnóstico diferencial da ceratose actínica é a distinção entre o CCE inicial e a ceratose actínica, uma vez que o CCE possui potencial metastático. Entretanto, mesmo entre dermatologistas existe uma grande variação no diagnóstico da ceratose actínica (BERMAN et al., 2006).

O diagnóstico baseia-se nos achados clínicos e necessita de confirmação histopatológica (STOCKFLETH & KERL, 2006). Um método promissor é a microscopia confocal por reflectância, que é utilizada também na avaliação dos achados histopatológicos de neoplasias cutâneas não melanocíticas, como por exemplo, o carcinoma de células basais (ULRICH et al., 2007).

O termo “ceratose actínica” refere-se à descrição clínica de uma doença que possui diagnóstico histológico e baseia-se somente nestes achados (RÖWERT-HUBER et al., 2007). As alterações epidérmicas são variáveis e dependem do estágio da doença. Os principais achados são hiperplasia e displasia na epiderme. Quando estas ocorrem sem invasão da membrana basal, há ceratose actínica (GROSS et al., 2005). Outros achados incluem atipia da epiderme e do epitélio superficial do folículo piloso e hiperceratose, principalmente paraceratose (SCOTT et al., 2001). A displasia envolvendo todas as camadas da epiderme define o carcinoma *in situ*, ou doença de Bowen (BERMAN et al., 2006). Por outro lado, quando há penetração da derme, significa que o CCE já está instalado, o que pode ocorrer em lesões avançadas (GROSS et al., 2005). É impossível prever qual ceratose actínica se tornará mais espessa e invasiva, com potencial de crescimento destrutivo, seguida do desenvolvimento de CCE metastático (STOCKFLETH & KERL, 2006).

Na ceratose actínica, assim como na pele cronicamente exposta à luz UV, o tecido conectivo apresenta alterações degenerativas chamadas de degeneração basofílica ou elastose, que pode ser considerada um indicador de exposição solar cumulativa na derme. Este processo caracteriza-se por degeneração de colágeno e substituição da matriz extracelular por uma rede de material elástico alterado (SILVA et

al., 2006). Como a epiderme é a primeira a absorver os componentes oncogênicos da luz solar, espera-se que quanto maior a área de elastose solar, mais severa seja a atipia epitelial (CHO et al., 1999).

Lesões iniciais apresentam melhora clínica com o uso de fotoprotetores e evitando-se exposição solar. Se houver prurido ou dor, glicocorticóides tópicos ou por via oral são benéficos. Lesões avançadas requerem a utilização de retinóides sistêmicos como isotretinoína, etretinato ou acetretina, criocirurgia ou remoção cirúrgica (SCOTT et al., 2001).

Acredita-se que o mecanismo pelo qual a luz UV leva à progressão da ceratose actínica para o CCE seja a mutação do gene supressor de tumor, p53 (MORTIER et al., 2002; LEBWOHL, 2003). Uma pesquisa realizada com pacientes humanos de pele clara acometidos por ceratose actínica concluiu que a incidência de mutações no gene p53 foi em torno de 75-80% (ORTONNE, 2002). Além disso, estudos moleculares determinaram que o p53, o gene supressor de tumor que apresenta maior frequência de mutação no CCE, é também um local comum de alterações mutacionais nos ceratinócitos presentes na ceratose actínica (MORTIER et al., 2002).

Muitos autores definem a ceratose actínica como uma lesão pré-neoplásica que pode evoluir para CCE (ORTONNE, 2002; COCKERELL, 2003; LEBWOHL, 2003). PAPADOGIANNAKIS et al. (2008) descreveram o caso de um Dogo argentino que meses após o diagnóstico inicial de ceratose actínica apresentou múltiplos nódulos e úlceras em flanco e abdômen, com diagnóstico histopatológico de CCE. HARGIS et al. (1977) relataram que dentre 423 cães da raça Beagle com ceratose actínica, 13 evoluíram para CCE.

Entretanto, outros pesquisadores consideram a ceratose actínica como CCE *in situ* (ORTONNE, 2003) e ainda outros postulam que não há diferença patobiológica entre a ceratose actínica e o CCE e que ambos representam a continuação de uma doença (LEBWOHL, 2003; RÖWERT-HUBER et al., 2007). STOCKFLETH & KERL (2006) afirmam que clinicamente não existe distinção entre a ceratose actínica e o CCE.

De acordo com RÖWERT-HUBER et al. (2007), baseando-se no comportamento biológico, a ceratose actínica é uma neoplasia maligna. Esta progressão é análoga a outros tipos de neoplasias em humanos, como o melanoma *in situ*, que se torna

melanoma metastático, e os pólipos adenomatosos em cólon que se tornam câncer de cólon.

O CCE é uma das neoplasias malignas mais frequentes em cães, sendo o segundo tipo de neoplasia cutânea mais comum nesta espécie (ALMEIDA et al., 2001). Também chamado de carcinoma epidermóide, é uma neoplasia maligna com origem no epitélio estratificado escamoso da pele e de outras superfícies mucosas (GOLDSCHMIDT & SHOFER, 1992; WALDER, 1995; GROSS et al., 2005).

A etiologia em cães não é bem definida. O dano causado pela luz UV é um fator importante (SCOTT et al., 2001) e antígenos de papilomavírus foram encontrados em casos de CCE, sugerindo também uma etiologia viral desta neoplasia (NICHOLLS & STANLEY, 1999; ZAUGG et al., 2005). Outros fatores de risco já foram identificados em humanos, dentre eles a imunossupressão, as dermatopatias crônicas, a presença de úlceras, a exposição a carcinógenos químicos e as genodermatoses (ALAM & RATNER, 2001).

O CCE ocorre com maior frequência em cães com aproximadamente nove anos de idade e não há predileção sexual (ALMEIDA et al., 2001), podendo ser precedido pela ceratose actínica (WALDER, 1995), cistos foliculares (SCOTT et al., 2001) e lúpus eritematoso discóide (LED). Dois cães da raça Pastor Alemão desenvolveram CCE em lesões crônicas em plano nasal 4-6 anos após o diagnóstico histopatológico de LED (SCOTT & MILLER JR, 1995). Os cães de raças de pêlo curto e de coloração clara são predispostos, como Dálmata, Pit Bull, Dogue Alemão arlequim e Beagle (GROSS et al., 2005).

Acredita-se que a luz UV atinja a camada de células epidérmicas, onde as células precursoras deste tumor estão localizadas. A luz UV é absorvida pelo DNA e induz alterações em alguns genes destas células. A mutação mais importante ocorre no gene supressor de tumor, sendo o gene p53 o principal alvo da radiação UV. A inativação deste gene leva à proliferação celular. As alterações em DNA induzidas pela luz UV ocorrem principalmente nas pirimidinas por meio da produção de dímeros (ORTONNE, 2002).

Em cães, o CCE é uma neoplasia invasiva (ALMEIDA et al., 2001). A lesão pode ser proliferativa ou erosiva. A lesão proliferativa varia de uma placa eritematosa e firme

a uma lesão com aspecto de “couve-flor” que tende a ulcerar. A lesão erosiva inicialmente é crostosa e rasa, mas posteriormente evolui para uma úlcera profunda (WITHROW & MACEWEN, 2007). Alopecia e eritema estão presentes e as lesões podem ser únicas ou múltiplas (SCOTT et al., 2001). Assim como na ceratose actínica, as lesões acometem principalmente a região de abdômen ventral, flanco e parte medial de membros pélvicos (GROSS et al., 2005).

O diagnóstico diferencial de CCE solitário inclui várias desordens granulomatosas e neoplásicas. A citologia é útil para o estabelecimento do diagnóstico presuntivo e o diagnóstico definitivo baseia-se no exame histopatológico. O protocolo de tratamento pode incluir a remoção cirúrgica, criocirurgia, eletrocirurgia, hipertermia e radioterapia. Geralmente, a quimioterapia não é efetiva, entretanto, a aplicação intralesional de carboplatina e de cisplatina associada ao 5-fluorouracil, colágeno bovino e epinefrina foi efetiva em alguns casos (SCOTT et al., 2001).

Quanto à classificação histopatológica, o CCE em cães pode ser bem, moderadamente e pouco diferenciado, acantolítico, de células fusiformes e verrucoso. Atualmente, os autores incluem o moderadamente diferenciado na categoria de bem diferenciados (GROSS et al., 2005). A maioria dos CCE é do tipo bem diferenciado. Estes tumores exibem blocos irregulares de ceratinócitos que invadem a derme. É comum existirem pérolas córneas, pontes intercelulares evidentes, mitoses e atipia (SCOTT et al., 2001).

Um estudo recente realizado por VELAZQUEZ et al. (2008) revelou que o grau histológico e a invasão perineural em pacientes humanos acometidos por CCE peniano são fatores prognósticos mais importantes do que a profundidade do tumor e a invasão de vasos sanguíneos. Na população estudada, 69% dos pacientes que apresentaram invasão perineural e 63% dos pacientes portadores de CCE pouco diferenciado desenvolveram metástase em linfonodo regional.

RODIN et al. (1967) demonstraram que o espaço perineural não possuía vasos linfáticos. Esta descoberta descartou a teoria previamente estabelecida, de que a invasão perineural consistia na disseminação de células neoplásicas via vasos linfáticos, localizados no espaço perineural. AYALA et al. (2004) discorreram sobre a provável patogênese da interação entre as células neoplásicas e os nervos. Estes

autores afirmaram que neoplasias com invasão perineural apresentam níveis elevados da molécula de adesão de célula neural (NCAM). Esta, quando ligada a membrana celular, provoca ligação do fator nuclear Kb (NF*k*B) ao DNA e ativação da transcrição nos neurônios e astrócitos. A relação entre NF*k*B e NCAM é bidirecional, pois o oxido nítrico também estimula a ligação da proteína ao sítio do NF*k*B para ativação do gene NCAM.

Em medicina veterinária, fatores como invasão perineural e profundidade tumoral ainda não foram estudados. Entretanto, esses dados são importantes, pois permitiriam o estabelecimento de prognóstico mais adequado, assim como uma melhor abordagem terapêutica (GROSS et al., 2005).

Foi realizada uma pesquisa com o objetivo de avaliar a expressão da E-caderina e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em tecidos caninos histologicamente classificados como CCE, buscando-se uma correlação com o grau histológico destes tumores. A autora concluiu que a expressão destes dois marcadores foi útil para estabelecer o prognóstico em cães (JOÃO, 2008).

STOCKFLETH et al. (2002) observaram que 40% de pacientes humanos transplantados desenvolveram lesões de pele neoplásicas ou pré-neoplásicas no período de 5 anos após a realização do transplante. Além disso, DINEHART et al. (1990) demonstraram que a imunossupressão é um fator de risco para doenças metastáticas em pacientes com CCE.

BERHANE et al. (2002) concluíram que a inflamação está associada à progressão da ceratose actínica para CCE. Com a inflamação, há uma perda gradual da diferenciação, levando à malignidade (ORTONNE, 2002). As citocinas produzidas pelos leucócitos inflamatórios podem induzir crescimento, motilidade ou neovascularização tumoral (BERHANE et al., 2002). Acredita-se que as prostaglandinas tenham participação no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (HOWE, 2007). A primeira etapa na síntese das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico é controlada pela enzima prostaglandina G/H sintetase, também chamada de cicloxigenase (COX) (ALMEIDA et al., 2001).

A COX é uma enzima bifuncional que exerce atividade cicloxigenase e peroxidase. A atividade cicloxigenase é importante na conversão inicial do ácido

araquidônico em prostaglandina (PG) G_2 e a atividade peroxidase converte a PGG_2 em PGH_2 (JOO et al., 2006).

Atualmente, são conhecidas duas isoformas da COX: cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2). A COX-1 modula respostas fisiológicas como a homeostase renal e vascular (BUCKMAN et al., 1998). Por outro lado, a COX-2 é a forma induzida e está particularmente envolvida na síntese de mediadores inflamatórios, como PGE_2 (ORTONNE, 2003). Geralmente, a COX-2 não é detectável na maioria dos tecidos normais, mas é rapidamente induzida por promotores tumorais, carcinógenos, citocinas e fatores de crescimento. A expressão aumentada de COX-2 foi demonstrada em diversas neoplasias caninas, assim como o seu envolvimento na carcinogênese (DE NARDI et al. 2005).

KLEITER et al. (2004) observaram que cães portadores de neoplasias nasais de origem epitelial apresentaram pouca resposta à radioterapia e consideraram a possibilidade de que a resistência a esta modalidade terapêutica estivesse associada à expressão da COX-2. Houve imunomarcação em 17 dentre 21 (81%) tumores, como CCE, carcinoma e adenocarcinoma nasais. Uma pesquisa brasileira concluiu que a expressão de COX-2 está correlacionada ao grau histológico e comportamento biológico em carcinomas mamários em cadelas e que esta enzima pode ser utilizada como fator preditivo de potencial metastático (DE NARDI et al., 2005).

ALMEIDA et al. (2001) investigaram a expressão de COX-2 em 40 amostras de CCE em cão e os resultados revelaram forte imunomarcação nos ceratinócitos neoplásicos em todas as amostras. PRONOVOST et al. (2004) utilizaram um sistema *in vitro* para investigar o papel da COX-2 na carcinogênese do CCE em cães. Os resultados demonstraram que os ceratinócitos neoplásicos apresentaram maior expressão de COX-2 do que os ceratinócitos normais. Nas duas linhagens celulares, quando estimuladas com um promotor tumoral, houve aumento da enzima COX-2, com uma indução maior de COX-2 no CCE do que nas células normais. Além disso, as células dos CCE produziram mais PGE_2.

Outra pesquisa teve como objetivo investigar a expressão de COX-2, utilizando reação imunoistoquímica em pele normal e em neoplasias cutâneas não melanocíticas

em humanos. A pele normal não apresentou imunorreatividade para COX-2 na epiderme, tampouco na derme, enquanto a expressão de COX-2 foi proeminente na ceratose actínica, CCE e doença de Bowen (ORTONNE, 2003). Um estudo *in vitro* com ceratinócitos humanos submetidos à irradiação de luz UVB revelou aumento da expressão de COX-2 por estas células, o que sugere o envolvimento da COX-2 no desenvolvimento de tumores de pele provocados por exposição prolongada ao sol (BUCKMAN et al., 1998). Finalmente, existe uma relação entre a expressão de COX-2 e a hiperplasia e displasia da epiderme em modelos experimentais (NEUFANG et al., 2001).

A COX-2 é encontrada em lesões de pele pré-neoplásicas, como a polipose adenomatosa familiar (RISHIKESH & SADHANA, 2003) e a ceratose actínica, e pesquisadores sugerem um possível papel desta enzima no processo de progressão de uma lesão pré-neoplásica para uma neoplasia (BAKHLE, 2001).

Os mecanismos pelos quais a COX-2 atua na carcinogênese incluem a angiogênese, a apoptose, a imunomodulação, o metabolismo do câncer e a proliferação celular (RISHIKESH & SADHANA, 2003).

FOSSLIEN (2000) afirmou que há aumento da angiogênese em neoplasias que expressam COX-2. Esta enzima tem a capacidade de elevar a expressão do VEGF e de eicosanóides, como por exemplo, a PGE_2 (ORTONNE, 2003). Ao analisar camundongos portadores de neoplasia gastrintestinal, foi possível observar que inibidores não seletivos de COX suprimiram o processo de angiogênese, reduzindo a expressão do VEGF e do fator de crescimento fibroblástico (FGF) (SAWAOKA et al., 1999).

TSUJII & DUBOIS (1995) demonstraram que as células intestinais que possuem elevada expressão de COX-2 são resistentes à apoptose. Alguns autores especulam que uma proteína associada a apoptose, chamada nucleobindina, ou a modulação intracelular de ácido araquidônico possam estar envolvidos com o mecanismo pelo qual ocorre inibição da apoptose (SUBBARAMAIAH et al., 1999).

O aumento na síntese de prostaglandinas como a PGE_2 pela COX-2 provoca a redução da resposta imune do hospedeiro, dificultando assim a eliminação de células neoplásicas. Ocorre inibição da atividade de células T, “natural killer” e macrófagos, da

produção de anticorpos e citocinas (FISCHER, 1997). ALMEIDA et al. (2001) observaram diminuição da imunidade celular em pacientes humanos acometidos por CCE de cabeça e pescoço.

A atividade peroxidase da COX possui evidente especificidade e é capaz de oxidar diversos xenobióticos, incluindo pró-carcinógenos e carcinógenos. Compostos como aflatoxinas, halógenos, pesticidas halogênicos e hidrocarbonetos policíclicos, cujos hidroperóxidos são produzidos no organismo, atuam via atividade peroxidase para formar carcinógenos mutagênicos (RISHIKESH & SADHANA, 2003).

A expressão elevada de COX-2 em células do endotélio intestinal em camundongos resultou em aumento da expressão da proteína Bcl-2, a qual é importante na regulação da apoptose, e expressão reduzida de caderina-E, o que indica proliferação celular e invasividade. Estas evidências sugerem uma relação entre COX-2 e proliferação celular (FISCHER, 1997).

A expressão da COX-2 após exposição solar prolongada é acompanhada pela elevação da proliferação de ceratinócitos. Estas observações sugerem que a expressão da COX-2 seja necessária para a proliferação e sobrevivência dos ceratinócitos após irradiação UV aguda (ORTONNE, 2003).

Com relação à proliferação celular, sabe-se que a capacidade proliferativa pode influenciar o quadro clínico e conseqüentemente o prognóstico (JOO et al., 2006). Em 1983, GERDES et al. produziram um anticorpo monoclonal de camundongo que reconhecia um antígeno nuclear presente em células em proliferação, mas não em células em repouso, conhecido como Ki-67. Sua expressão começa a ser detectada na fase S do ciclo celular, aumenta na fase G2, atingindo seu maior pico na fase M (ENDL & GERDES, 2000).

A expressão da proteína Ki-67 por meio de reação imunoistoquímica é amplamente utilizada para avaliar o índice de proliferação celular e possui valor prognóstico em neoplasias mamárias em cadelas (ZUCCARI et al., 2008) e em cães portadores de melanoma (ROELS et al., 1999; LAPRIE et al., 2001). AL-DISSI et al. (2007) pesquisaram a expressão de Ki-67 em CCEs em cães e perceberam que o aumento no índice de proliferação celular estava relacionado a expressão elevada de VEGF.

WEBSTER et al. (2008) avaliaram a expressão de Ki-67 em cães acometidos por mastocitoma cutâneo e submetidos ao protocolo quimioterápico a base de vimblastina e prednisona. Os resultados revelaram que uma alta expressão de Ki-67 está associada à redução no tempo livre da doença e também da sobrevida. Além disso, de acordo com KIYOKAZU et al. (2007), uma baixa expressão de Ki-67 em cães com esta neoplasia foi relacionada a maior sobrevida. OH & PENNEYS (2004) e SILVA et al. (2006) concluíram que a expressão de Ki-67 também possui valor prognóstico em doenças pré-neoplásicas em humanos, como a ceratose actínica.

Além disso, a atividade proliferativa determinada por meio de marcação imunoistoquímica pode também ser associada à susceptibilidade do tumor à quimioterapia, uma vez que a maioria dos fármacos antineoplásicos atua na divisão celular (WEBSTER et al., 2007).

As anormalidades em núcleo são bem descritas na ceratose actínica, logo, estas alterações podem ser utilizadas como biomarcadores sensíveis para a prevenção de tumores de pele. Em humanos, a progressão de pele normal para pele lesada pelo sol e desta última para a ceratose actínica foi acompanhada por irregularidade na forma e no tamanho nuclear (CARPENTER et al., 2004).

O índice mitótico (IM) corresponde à mensuração indireta da proliferação celular baseada na quantificação de figuras de mitose presentes na lâmina (ROMANSIK et al., 2007). MULAS et al. (1999) determinou o IM em tumores de pele e tecido subcutâneo em cães, como CCE, carcinoma de células basais, mastocitoma e histiocitoma com o objetivo de correlacionar este índice ao comportamento biológico dos tumores. ROMANSIK et al. (2007) concluíram que o IM possui alto valor preditivo em relação à sobrevida de cães portadores de mastocitoma cutâneo. Além disso, o IM está associado à evolução clínica em outras neoplasias caninas, como sarcomas de tecidos moles, neoplasias mamárias e melanoma cutâneo (KUNTZ et al., 1997; SARLI et al., 2002; SPANGLER & KASS, 2006).

O IM possui valor prognóstico importante em neoplasias em humanos, como carcinoma mamário (BIESTERFELD & REITMAIER, 2001), carcinoma uterino (KAMOI

et al., 2001), CCE em cavidade oral (REIBEL, 2003; ANKLE, et al. 2007) e melanoma maligno cutâneo (BARNHILL et al., 2005).

O índice mitótico e a expressão da proteína Ki-67 (MIB-1) são métodos que permitem avaliar a proliferação celular em um tecido, com o objetivo principal de diferenciar lesões malignas e benignas (ROMANSIK et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar se é possível estabelecer o prognóstico de cães com ceratose actínica e CCE cutâneo baseando-se nos dados referentes às características populacionais, índice de proliferação celular e expressão de COX-2.

3.2. Objetivos específicos

- investigar e correlacionar a proliferação celular, por meio da expressão da proteína Ki-67 (MIB-1) e do índice mitótico, e a expressão da COX-2 em lesões cutâneas caninas caracterizadas como ceratose actínica e CCE;
- caracterizar a população canina acometida pela ceratose actínica e pelo CCE cutâneo;
- relacionar o prognóstico dos cães com os índices de proliferação celular e a expressão da COX-2;
- avaliar os diferentes graus histológicos de CCE cutâneo e relacioná-los ao índice de proliferação celular e expressão de COX-2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção das amostras

Foram analisadas amostras de pele obtidas de 10 cães com diagnóstico histopatológico de ceratose actínica e de 10 cães com diagnóstico histopatológico de CCE cutâneo, do arquivo do Laboratório de Patologia Veterinária Werner & Werner Ltda, situado em Curitiba-PR. Os animais foram provenientes de atendimentos realizados entre dezembro de 2006 e novembro de 2007, sendo 17 oriundos de clínicas particulares e 3 do Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Jaboticabal.

Os cães foram incluídos na pesquisa após autorização e consentimento de todos os proprietários. Os prontuários dos cães foram analisados em relação à raça, ao sexo, à idade, ao aspecto da lesão, à topografia das lesões e à procedência dos pacientes. Os proprietários foram questionados sobre o ambiente, a exposição ao sol, o histórico familiar, o uso de medicações imunossupressoras, o *status* reprodutivo, a ocorrência de dermatopatias crônicas e a alimentação.

Para a obtenção das amostras de pele normal que formaram o grupo controle, foram realizadas biópsias em cinco animais adultos pertencentes ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal. Optou-se por coletar as amostras da região do tórax lateral direito, mediante biópsia incisional, com auxílio de "punch" de 6mm. Os cães tinham dois anos de idade, sendo um macho e quatro fêmeas, todos sem raça definida. As amostras foram cuidadosamente enxutas para remover o sangue, colocadas com o lado da epiderme para baixo em um pedaço de madeira para minimizar os artefatos induzidos pelo encolhimento e fixadas em formalina tamponada por fosfato a 10%, respeitando-se o mínimo de dez partes de formalina para uma parte de tecido, durante 24 horas.

Posteriormente, estas amostras foram conservadas em álcool 70% para melhor qualidade da reação de imunoistoquímica.

4.2. Exame histopatológico

Foram realizados cortes de 3μm da amostra parafinada para coloração pela Hematoxilina-eosina (H.E.) seguida da confirmação do diagnóstico histopatológico de CCE cutâneo e ceratose actínica. O grupo-controle foi submetido ao mesmo procedimento, com o intuito de confirmar a ausência de alterações histopatológicas.

Para que fossem formados grupos homogêneos, o diagnóstico histopatológico foi confirmado por dois dermatopatologistas (Juliana Werner e Rafael Torres Neto). Em seguida, os cortes foram separados em grupos experimentais, sendo G0 (n=5), grupo-controle; G1 (n=10), formado por ceratose actínica e G2 (n=10), formado por CCE cutâneo.

Utilizaram-se os critérios histopatológicos de acordo com GROSS et al. (2005) para estabelecer o diagnóstico de ceratose actínica e CCE, e a classificação deste último de acordo com o grau histológico.

4.3. Índice mitótico

Com o objetivo de obter-se o IM, foi feita a contagem das figuras de mitose, típicas e atípicas, nas amostras de G0, G1 e G2. A contagem foi realizada nas amostras fixadas em lâminas e coradas por H.E., em microscópio óptico, por um único observador. Utilizou-se uma ocular com gratícula integrada Nikon (Nikon, Inc. – Japan), para orientação e definição da área, com aumento de 400 vezes, sendo a ocular de 10X e a objetiva de 40X. Em cada lâmina foram contados dez campos e ao final foi estabelecida a média destes valores.

4.4. Estudo imunoistoquímico

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com espessura de 3µm e distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com Poly-L-Lysina (Sigma P8920). O objetivo do procedimento foi promover maior aderência dos cortes às lâminas de vidro e evitar assim a perda do material durante o processamento imunoistoquímico. As lâminas foram levadas a estufa à temperatura de 60ºC por 24 horas e, a seguir, transferidas para cubas de plástico vertical a fim de se proceder à imunoistoquímica.

A técnica de imunoistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica, sob responsabilidade da Profa. Dra. Renée Laufer Amorim, do Serviço de Patologia da FMVZ - UNESP/Botucatu. As soluções e os reagentes utilizados estão descritos no anexo 1.

Inicialmente, as amostras foram desparafinizadas com o uso de baterias de xilol e álcool e hidratadas com água destilada. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato 10Mm, pH 6,0 em forno de microondas, por três ciclos de 5 minutos cada. O nível da solução tampão foi conferido a cada intervalo e se necessário, a solução à mesma temperatura era reposta. Em seguida as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e submetidas ao bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de metanol e água oxigenada 10 volumes, na proporção de 19:1. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada (10 vezes) e mantidas em solução tampão TRIS, pH 7,4 até a proceder-se à incubação dos anticorpos primários. Utilizaram-se os anticorpos primários COX-2 (anti-COX-2, monoclonal, clone CX-294, código M3617, DakoCytomation) e Ki-67 (anti-Ki-67, monoclonal, clone MIB-1, código M7240, DakoCytomation).

Estes anticorpos foram diluídos em solução diluente que possui propriedades redutoras de fundo (S3022; DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). As lâminas foram mantidas em câmara úmida e incubadas por 18 horas (“overnight”) a 4℃ em geladeira. A diluição foi de 1:50 para ambos os anticorpos primários. Para o sistema de detecção

e amplificação dos anticorpos primários utilizou-se EnVision (K4061; EnVision+Dual Link System, Peroxidase, DakoCytomation). As lâminas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Para visibilização da reação foi utilizado o cromógeno DAB (K3466; Liquid Dab Large Volume Substrate Chromogen System-3,3'dimainobenzidina, DakoCytomation). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas em bálsamo do Canadá.

As lâminas utilizadas como controles negativos para COX-2 e Ki-67 (MIB-1) foram submetidas ao mesmo protocolo, com exceção de que o anticorpo primário foi substituído por imunoglobulina de camundongo (Universal Negative Control - Mouse Primary Antibodies, N1698, DakoCytomation). Cortes histológicos de rim de um cão adulto clinicamente sadio foram utilizados como controle positivo para COX-2.

O percentual de positividade para COX-2 foi obtido pela contagem de células imunorreativas com o auxílio de um equipamento analisador de imagens Leica QWin Plus, que permite a captura de imagens pela câmera digital Leica DFC, acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR). Na avaliação da imunoexpressão de COX-2 foram contados cinco campos em aumento de 200 vezes para cada caso analisado, considerando-se especificamente a epiderme. Avaliou-se a porcentagem de células marcadas (Tabela 1) e a intensidade de coloração de cada campo (Tabela 2), conforme preconizado por DORÉ et al. (2003) e HELLER et al. (2005) e utilizado com sucesso por DE NARDI et al. (2005).

Tabela 1. Pontuação atribuída ao percentual de células marcadas por campo na epiderme dos cães de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009.

Percentual de células marcadas por campo	**Pontuação**
< 5%	0
5-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
> 75%	4

Tabela 2. Pontuação atribuída à intensidade de coloração das células marcadas por campo na epiderme dos cães de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009.

Intensidade de coloração	Pontuação
Fraca	1
Moderada	2
Intensa	3

Ao final, estabeleceu-se um escore que variou entre zero e 12 pontos, obtido a partir da multiplicação da pontuação referente ao percentual de células marcadas pela pontuação da intensidade de coloração. Foi feita uma média dos cinco escores obtidos em cada campo.

A contagem das células imunomarcadas pelo anticorpo Ki-67 (MIB-1) foi feita com o auxílio de um equipamento analisador de imagens Leica QWin Plus, que permite a captura de imagens pela câmera digital Leica DFC, acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR). Foi estabelecido que somente as células com marcação nuclear forte e acastanhada fossem consideradas. Avaliou-se um campo em aumento de 400 vezes para cada caso analisado, obtendo-se assim a contagem mínima de 100 células, entre positivas e negativas, sempre avaliando o campo por completo, conforme adaptação da metodologia utilizada por AL-DISSI et al. (2007). Ao final, os valores foram transformados em percentual de células positivas e submetidos à análise estatística.

4.5. Avaliação clínica do prognóstico

O acompanhamento da evolução clínica dos animais foi feito por meio de ligações telefônicas aos proprietários e aos médicos veterinários responsáveis. Estes foram questionados quanto à presença de metástases, recidiva, remissão da doença e tempo de sobrevida dos pacientes após o diagnóstico.

4.6. Análise estatística

A análise de variância pelo teste F foi utilizada para avaliar se houve diferença entre os grupos em relação ao IM. Os dados referentes ao estudo imunoistoquímico foram avaliados por meio de análise de variância pelo teste F, para comparação entre grupos, e pelo teste de Tukey, para comparação das médias, de acordo com delineamento inteiramente casualizado. Para avaliar a correlação existente entre a imunomarcação para COX-2, Ki-67 e o IM, utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson. Os resultados foram submetidos ao programa *Statistical Analysis System* (SAS, versão 9.0., SAS Institute, Cary, NC, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Exame histopatológico

As lesões diagnosticadas como ceratose actínica exibiram achados histopatológicos na epiderme caracterizados por hiperplasia, paraceratose (Figura 1), ortoceratose, perda da polaridade dos ceratinócitos, pleomorfismo celular moderado, desorganização das camadas da epiderme (Figura 2), degeneração hidrópica nas células escamosas e núcleos com mais de um nucléolo evidente.

No tecido conjuntivo frouxo localizado na derme observou-se proliferação de fibroblastos e áreas de degeneração do colágeno. Ainda nessa localização, as fibras elásticas apresentavam-se degeneradas evidenciando o quadro de elastose solar. Nos anexos cutâneos notaram-se folículos pilosos apresentando dilatação cística infundibular por hiperceratose. Em alguns casos também haviam colônias bacterianas com proliferação de neutrófilos caracterizando uma infecção secundária.

Quanto à classificação histológica, em G2 foram observados CCE bem diferenciado em oito cães e CCE acantolítico em dois cães. Dentre os dez cães de G2, sete apresentaram ceratose actínica em pele adjacente. Os CCE cutâneo bem diferenciados exibiram alterações epidérmicas como hiperplasia, hiperceratose, paraceratose, acantose e abundante proliferação de ceratinócitos neoplásicos invadindo a derme (Figura 3). Essas células neoplásicas, cuja origem se dá no epitélio escamoso da epiderme, apresentaram-se de tamanho aumentado, tendendo a se manter em blocos com moderada atipia nuclear, com formato variando de ovalado a alongado (Figura 4). Entremeado as células neoplásicas notou-se a presença de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e polimorfonucleares. Em alguns desses blocos pôde-se observar a presença de pérolas córneas.Os nucléolos apresentaram-se atípicos e numerosos com delimitado citoplasma de coloração rósea. A relação núcleo/citoplasma estava aumentada com marcada disceratose.

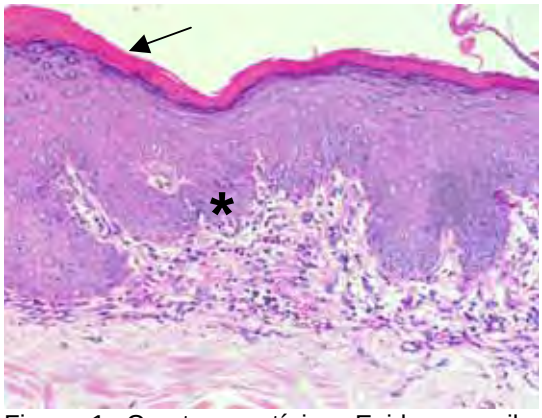


Figura 1. Ceratose actínica. Epiderme exibe hiperplasia irregular, com formação de cristas (*) e paraceratose compacta confluente (seta). Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.

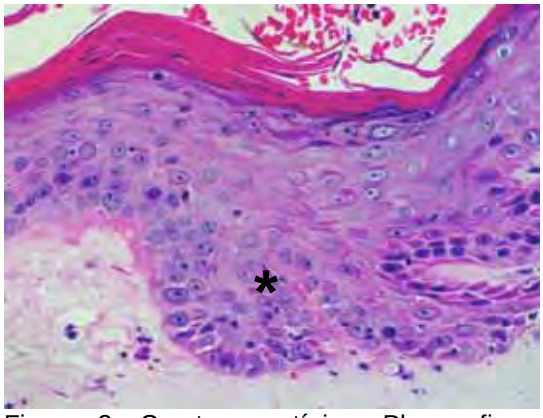


Figura 2. Ceratose actínica. Pleomorfismo celular, perda da polaridade dos ceratinócitos e desorganização das camadas da epiderme (*). Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.

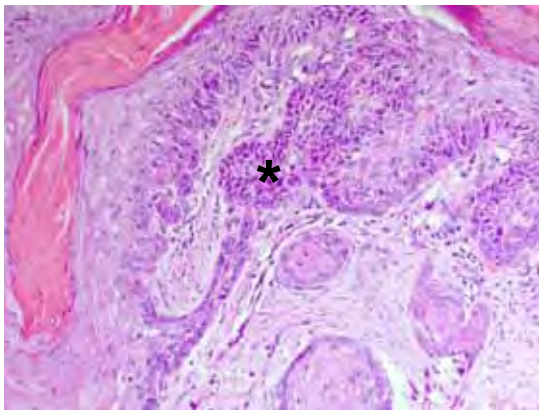


Figura 3. CCE bem diferenciado. Hiperplasia irregular em epiderme.Proliferação neoplásica dos ceratinócitos e invasão da derme (*). Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.

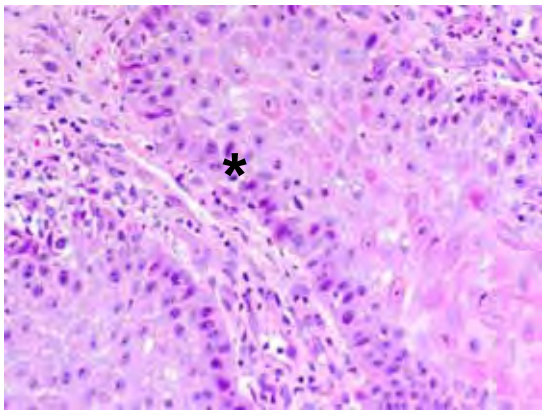


Figura 4. CCE bem diferenciado. Ceratinócitos de tamanho aumentado e atipia nuclear (*). Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.

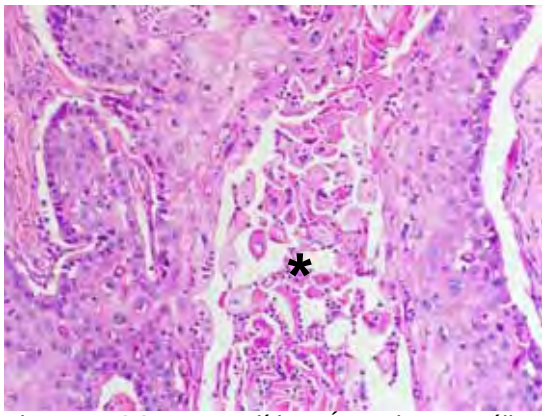


Figura 5. CCE acantolítico. Área de acantólise (*). Coloração: H.E. 200X. Jaboticabal, 2009.

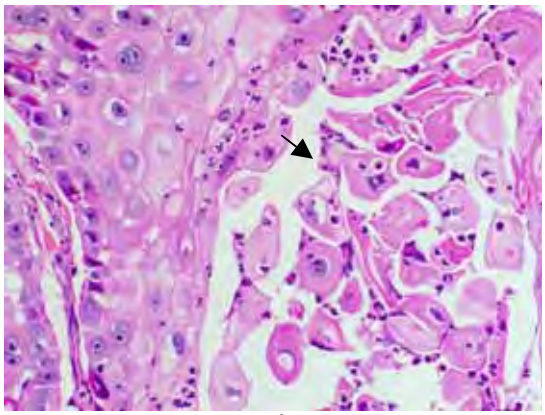


Figura 6. CCE acantolítico. Notar perda das junções intercelulares (seta). Coloração: H.E. 400X. Jaboticabal, 2009.

Foi observada elastose solar, caracterizada pela degeneração basofílica das fibras elásticas. A invasão perineural é considerada um fator prognóstico importante e foi observada em um caso de CCE bem diferenciado.

Os dois casos de CCE acantolítico exibiram áreas extensas de acantólise, sendo este padrão predominante (Figura 5). Observou-se a formação de estruturas pseudoglandulares originadas do centro de aglomerados de células epiteliais devido à perda das junções intercelulares (Figura 6). Pequenos focos de CCE bem diferenciado em algumas áreas das neoplasias estavam presentes. Invasão de vasos linfáticos por células neoplásicas foi identificada em um caso de CCE acantolítico.

5.2. Dados de frequência

Os dados de frequência estão descritos nos anexos 2 e 3. Em G1 houve maior frequência em cães da raça Pit Bull (5/10), seguidos por aqueles da raça Boxer (2/10), Dogo Argentino (1/10), Dogue Alemão (1/10) e Bull Terrier (1/10). Em G2 também houve maior frequência em cães da raça Pit Bull (6/10), seguidos por aqueles da raça Dogo Argentino (2/10), Boxer (1/10) e Terrier Brasileiro (1/10) (Figura 7).

A média de idade dos cães de G1 e G2 foi de 4,3 (±0,8) anos e 5,6 (±1,7) anos, respectivamente (Figura 8). Houve maior frequência de fêmeas em relação aos machos em G1 (7 fêmeas e 3 machos) e G2 (6 fêmeas e 4 machos). Todos os cães de G1 e G2 possuíam pelame curto e de coloração branca em cerca de 90% da superfície corporal, com exceção de um cão da raça Terrier Brasileiro, que era tricolor, que apresentou lesões em área glabra e de pelame branco.

A distribuição topográfica das lesões cutâneas nos cães de G1 incluiu região de abdômen ventral (6), flanco (4), bolsa escrotal (2), região lateral do tórax (2), parte medial de membros pélvicos (2) e plano nasal (2). Em G2, a distribuição topográfica incluiu região de abdômen ventral (6), região lateral do tórax (2), flanco (1), bolsa escrotal (1), parte medial de membros pélvicos (1), membro torácico (1), plano nasal (1) e dorso (1) (Figura 9).

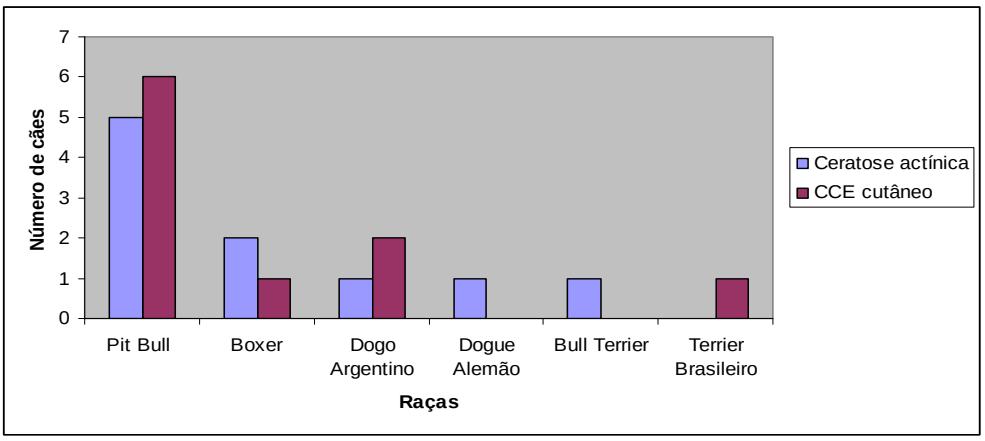


Figura 7. Frequência de ceratose actínica e CCE cutâneo de acordo com a raça dos cães. Jaboticabal, 2009.



Figura 8. Frequência de ceratose actínica e CCE cutâneo de acordo com a idade dos cães. Jaboticabal, 2009.

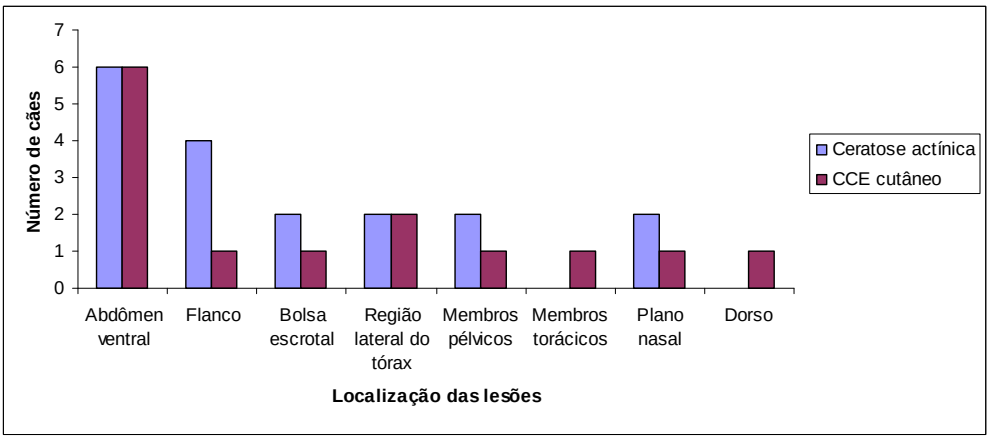


Figura 9. Distribuição topográfica das lesões de ceratose actínica e CCE cutâneo. Jaboticabal, 2009.

Nos casos de ceratose actínica, as lesões dermatológicas caracterizaram-se principalmente por alopecia, eritema, comedões, descamação, escoriação, pústulas, colaretes epidérmicos, crostas e cicatrizes. Foliculites bacterianas superficial e profunda foram achados frequentes (Figuras 10, 11, 12 e 13). Nos casos de CCE cutâneo, ocorreram lesões tanto do tipo erosiva quanto proliferativa (Figuras 14 e 15). As lesões dermatológicas caracterizaram-se principalmente por erosões, úlceras, nódulos, alopecia, eritema, escoriação, crostas e cicatrizes.

Os animais acometidos por ceratose actínica eram provenientes de Curitiba (5/10), Jaboticabal (3/10), Ribeirão Preto (1/10) e Salvador (1/10). Os cães acometidos por CCE cutâneo eram de Curitiba (7/10), Ribeirão Preto (2/10) e Brasília (1/10).

5.3. Índice mitótico

O índice mitótico médio foi 0,4; 4,6 (±3,6) e 4,9 (±2,6) em G0, G1 e G2, respectivamente, em dez campos em aumento de 400 vezes (Tabela 3). Em G1, baseando-se no valor médio do grupo, valores individuais de IM < 4,6 foram considerados baixo e IM > 4,6, alto. Em G2, baseando-se no valor médio do grupo, valores individuais de IM < 4,9 foram considerados baixo e IM > 4,9, alto. Foi possível observar figuras de mitose típicas e atípicas em G1 e G2. Não houve diferença entre G1 e G2, mas entre esses e G0 ($p>0,05$).

Tabela 3. Valores individuais e médios referentes aos índices mitóticos encontrados em G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009.

G0			G1			G2		
Cão	Número de figuras de mitose		Cão	Número de figuras de mitose		Cão	Número de figuras de mitose	
	Típicas	Atípicas		Típicas	Atípicas		Típicas	Atípicas
C1	2	0	1	1	1	11	4	3
C2	0	0	2	2	1	12	1	2
C3	0	0	3	2	2	13	1	1
C4	0	0	4	2	2	14	3	1
C5	0	0	5	0	2	15	0	2
-	-	-	6	0	3	16	0	2
-	-	-	7	1	1	17	4	2
-	-	-	8	10	4	18	0	6
-	-	-	9	2	1	19	2	6
-	-	-	10	3	4	20	3	6
Média	0,4		Média	4,6		Média	4,9	

5.4. Estudo imunoistoquímico

5.4.1. Imunomarcação para COX-2

A imunomarcação para a COX-2 foi difusa e inteiramente confinada ao citoplasma dos ceratinócitos, sendo evidente ao redor da membrana nuclear.

As amostras de G1 revelaram intensa expressão, a qual permeou toda a epiderme hiperplásica (Figura 16). A média dos escores das amostras foi 8,16 (±3,51) (Tabela 4). Foi estabelecido que valores acima da média do grupo seriam considerados “altos” e os valores inferiores à média, “baixos”. Uma alta porcentagem de células marcadas, assim como intensa expressão para a COX-2, também foi observada nos ceratinócitos neoplásicos em diferentes regiões da epiderme em todas as amostras de G2 (Figura 17), assim como nas áreas de ceratose actínica na pele adjacente. Observou-se imunomarcação apenas no componente epitelial da neoplasia, nenhuma expressão foi constatada nas células mesenquimais adjacentes ao tumor. A média dos escores foi 8,56 (±1,03) (Tabela 4). Não houve marcação para COX-2 em corte de pele normal.

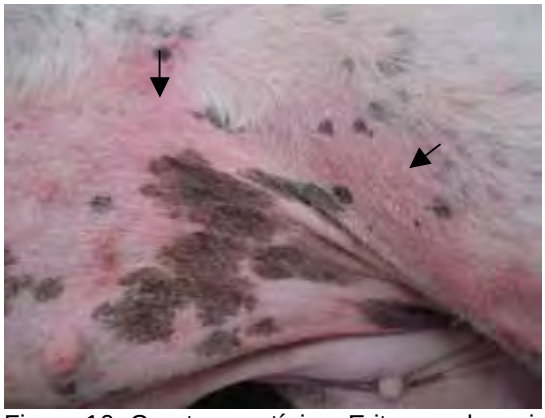


Figura 10. Ceratose actínica. Eritema, alopecia e crostas em região abdominal ventral (setas). Fêmea, 4 anos, Pit Bull. Jaboticabal, 2009.

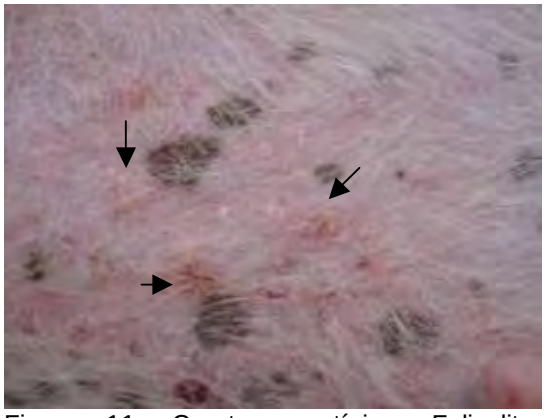


Figura 11. Ceratose actínica. Foliculite bacteriana superficial em região abdominal ventral (setas). Fêmea, 4 anos, Pit Bull. Jaboticabal, 2009.

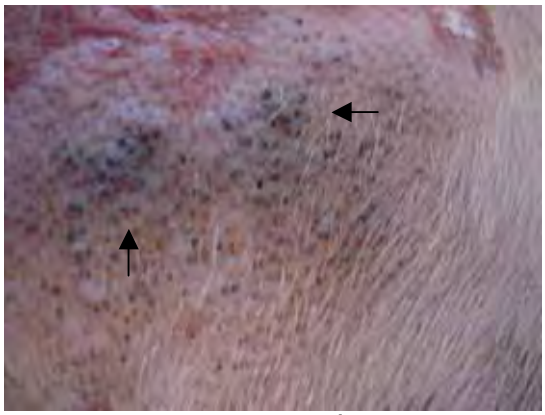


Figura 12. Ceratose actínica. Comedões actínicos em região abdominal ventral (setas). Fêmea, 5 anos, Pit Bull. Jaboticabal, 2009.



Figura 13. Ceratose actínica. Erosão, alopecia e eritema em membro pélvico direito (seta). Macho, 6 anos, Boxer. Curitiba, 2009.

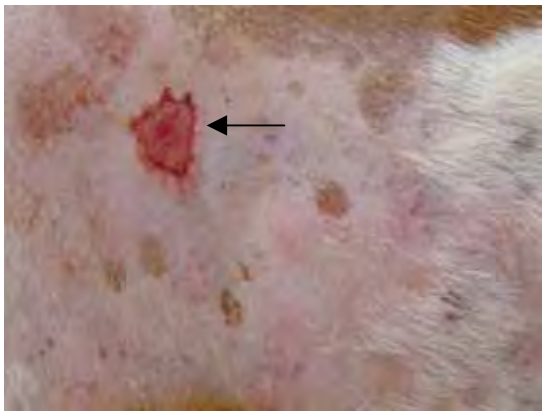


Figura 14. CCE cutâneo. Lesão erosiva na região lateral do tórax (seta). Fêmea, 6 anos, Pit Bull. Brasília, 2009.

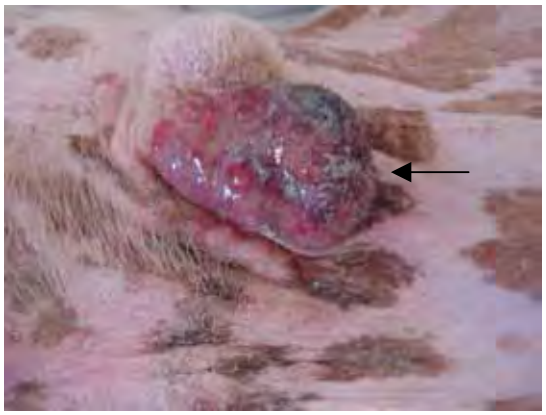


Figura 15. CCE cutâneo. Lesão proliferativa em prepúcio (seta). Macho, 6 anos, Boxer. Curitiba, 2009.

As células do endotélio vascular apresentaram marcação fraca para COX-2. Por outro lado, na derme superficial, dentre os anexos cutâneos, observou-se que houve marcação moderada nas células basais das glândulas sebáceas e no epitélio colunar das glândulas sudoríparas. Não houve imunomarcação para COX-2 na amostra utilizada como controle negativo (Figura 18). O corte de rim de cão utilizado como controle positivo apresentou intensa imunomarcação para COX-2 (Figura 19).

A reação imunoistoquímica não revelou variação na porcentagem de células marcadas para a atividade da COX-2 de acordo com o diagnóstico histopatológico. Não houve diferença significativa entre G1 e G2, mas entre esses e G0 ($p>0,05$).

Tabela 4. Valores individuais e médios dos escores referentes à imunomarcação de COX-2 nas amostras de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009.

G0		G1		G2	
Cão	Escore médio	Cão	Escore médio	Cão	Escore médio
C1	0	1	12	11	9,2
C2	0	2	8,0	12	8,4
C3	0	3	8,0	13	11,2
C4	0	4	8,0	14	8,0
C5	0	5	8,0	15	8,0
-	-	6	10,4	16	8,4
-	-	7	4	17	8,8
-	-	8	10,4	18	7,6
-	-	9	0,8	19	8,0
-	-	10	12	20	8,0
Média	0	Média	8,16	Média	8,56

5.4.2. Imunomarcação para a proteína Ki-67 (MIB-1)

A imunomarcação para Ki-67 (MIB-1) foi inteiramente confinada aos núcleos dos ceratinócitos e se caracterizou por uma coloração acastanhada. Em G1, a imunomarcação seguiu um padrão linear, principalmente nos ceratinócitos localizados nas camadas basal e escamosa ao longo de toda a epiderme hiperplásica (Figura 20). Em G2, os ceratinócitos neoplásicos exibiram imunomarcação nas camadas de células da periferia da neoplasia e nos agregados de células tumorais presentes na derme

(Figura 21). Houve imunomarcação em fibroblastos, células inflamatórias, células epiteliais dos folículos pilosos e células basais das glândulas sebáceas.

A porcentagem de células marcadas não variou de acordo com a classificação histopatológica. Não houve diferença estatística entre G1 e G2, mas entre esses e G0 ($p>0,05$). A média da porcentagem de células marcadas de G0, G1 e G2 foi 0,4; 15,77 (± 8,81) e 17,71 (± 12,21) (Tabela 5). Foi estipulado que valores acima da média do grupo fossem considerados “altos” e valores inferiores à média, “baixos”. Não foi observada positividade nos ceratinócitos quando o anticorpo primário não foi utilizado.

Tabela 5. Valores individuais e médios referentes à porcentagem de células positivas para a imunomarcação de Ki-67 (MIB-1) nas amostras de G0, G1 e G2. Jaboticabal, 2009.

G0		G1		G2	
Cão	Porcentagem de células positivas	Cão	Porcentagem de células positivas	Cão	Porcentagem de células positivas
C1	2	1	7,40	11	13,06
C2	0	2	19,54	12	12,91
C3	0	3	12,86	13	24,09
C4	0	4	21,92	14	18,71
C5	0	5	18,18	15	12,41
-	-	6	23,88	16	19,86
-	-	7	9,01	17	48,86
-	-	8	31,84	18	13,58
-	-	9	3,14	19	6,45
-	-	10	9,93	20	7,20
Média	0,4	Média	15,77	Média	17,71

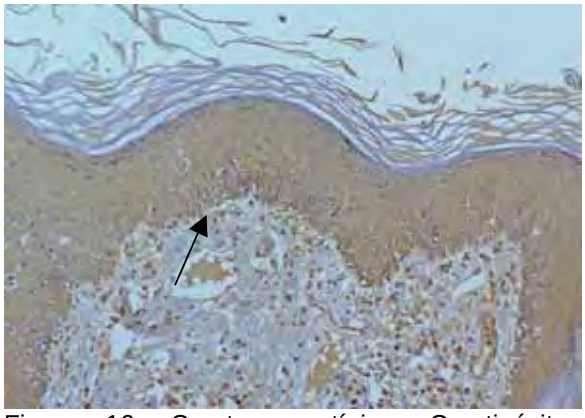


Figura 16. Ceratose actínica. Ceratinócitos marcados para COX-2 na epiderme (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

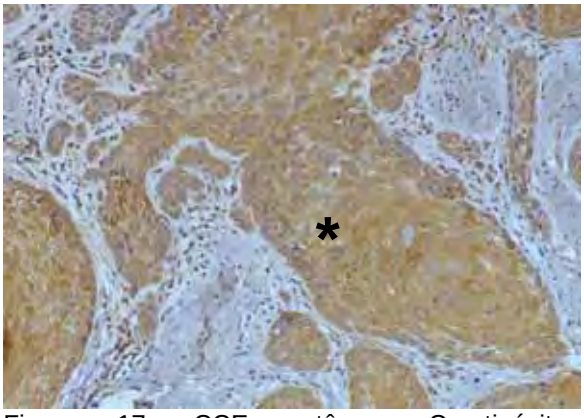


Figura 17. CCE cutâneo. Ceratinócitos neoplásicos marcados para COX-2, invadindo a derme (*). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

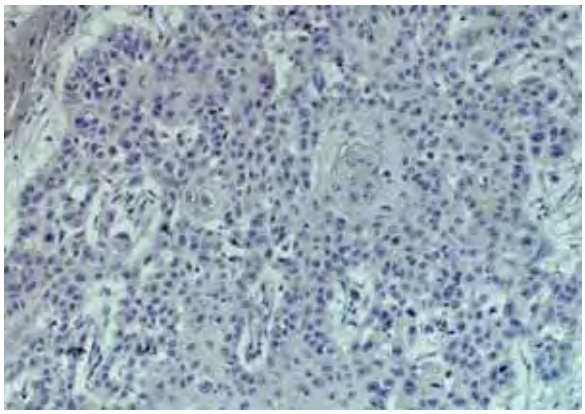


Figura 18. CCE cutâneo. Controle negativo para COX-2. Ausência de marcação. EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

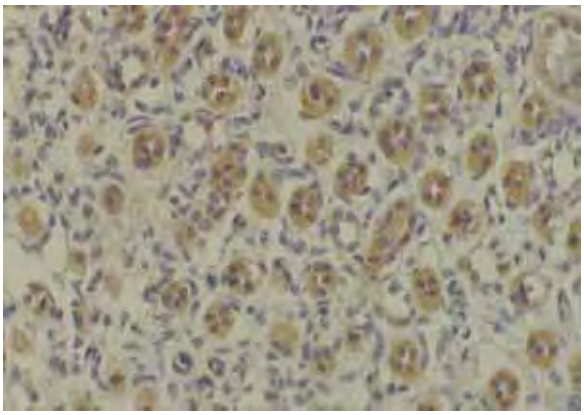


Figura 19. Rim. Controle positivo para COX-2 (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

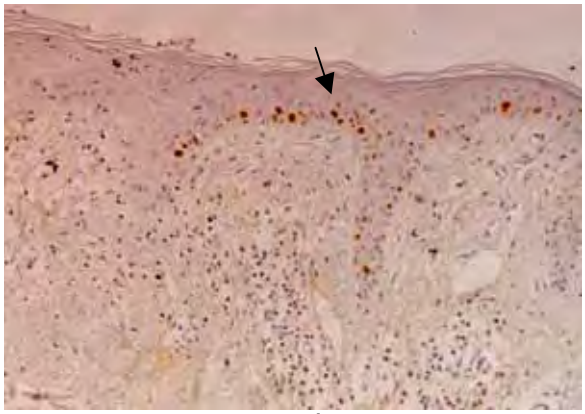


Figura 20. Ceratose actínica. Imunomarcação para Ki-67 em ceratinócitos (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

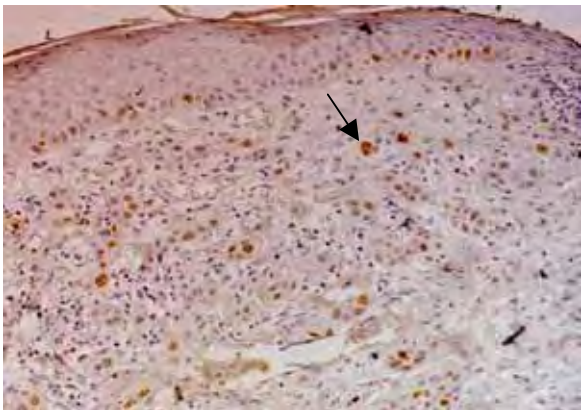


Figura 21. CCE cutâneo. Imunomarcação para Ki-67 em ceratinócitos, invadindo a derme (seta). EnVision, DAB, Hematoxilina de Mayer. 200X. Jaboticabal, 2009.

5.5. Correlação entre a imunomarcação para Ki-67 e COX-2 e o IM

Não houve correlação entre a expressão de COX-2 e de Ki-67 (Tabela 6) e o IM em G1 e G2 (r=0,32; p>0,05). Da mesma forma, não houve correlação significativa entre os diferentes graus histológicos do CCE cutâneo e a expressão da COX-2 e da proteína Ki-67 e IM.

Tabela 6. Valores médios e resultados obtidos na análise de variância para a imunomarcação de Ki-67 e COX-2 e IM em cães acometidos por ceratose actínica e por CCE cutâneo. Jaboticabal, 2009.

Grupo	Número de animais	Índice mitótico	Expressão Ki-67 (MIB-1)	Expressão COX-2
Ceratose actínica	10	4,6 [a]	17.71 [a]	8,56 [a]
CCE	10	4,9 [a]	15,77 [a]	8,16 [a]
Controle	5	0,4 [b]	0,25 [b]	0 [b]
Teste F		0,05 [**] p<0,01	7,16 ** p< 0,01	25,54 [**] p<0,01

**: significativo a 1% de probabilidade.
Médias seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5.6. Avaliação clínica do prognóstico

O cão n.02 apresentou evolução do quadro de ceratose actínica para CCE cutâneo. Esta amostra apresentou alta imunomarcação para Ki-67, baixa imunomarcação para COX-2 e baixo IM. Em G1, os cães n.01, 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09 e 10 apresentaram recidiva da doença e em G2, os cães n.11, 13, 15, 16, 17, 18 e 19 também apresentaram recidiva da neoplasia cutânea. Estas amostras apresentaram valores distintos de IM e expressão de Ki-67 e COX-2 e não foi possível estabelecer uma relação entre os marcadores e a taxa de recidiva. O cão n.18 apresentou um nódulo cerebral identificado por ressonância magnética, o qual é suspeito de ser uma

metástase da neoplasia cutânea. A amostra apresentou IM alto e expressão de Ki-67 e COX-2 baixas.

A classificação histológica nas amostras n.12 e n.15 foi de CCE acantolítico. Estas amostras apresentaram IM baixo e expressão de Ki-67 e COX-2 baixas. As demais amostras foram diagnosticadas como CCE bem diferenciados e apresentaram valores distintos de IM e expressão de Ki-67 e COX-2, não sendo possível estabelecer uma relação entre os marcadores e a classificação histológica. Na amostra do cão n.17 observou-se invasão perineural por células neoplásicas. Este corte obteve a maior porcentagem de células positivas para a proteína Ki-67 (MIB-1) de todo o grupo, correspondendo a 48,86%. Além disso, apresentou IM e expressão de COX-2 altos. Este cão apresentou recidiva da neoplasia em membro pélvico esquerdo 11 meses após o primeiro diagnóstico.

A sobrevida após o diagnóstico foi avaliada nos 20 cães estudados. Em G1, todos os animais estão vivos até o momento e a sobrevida variou de 15 a 24 meses. Em G2, o cão n.13 veio a óbito devido a transtorno hepático. O estudo imunoistoquímico revelou que esta amostra apresentou o maior escore médio para imunomarcação de COX-2, correspondendo a 11,2 e 24,09% de células positivas para a proteína Ki-67, além de duas figuras de mitose. Os demais cães estão vivos e a sobrevida variou de 14 a 25 meses.

6. DISCUSSÃO

As dermatopatias provocadas pela exposição excessiva à radiação solar são amplamente pesquisadas em medicina humana (CARPENTER et al., 2004; OH et al., 2004; BERMAN et al., 2006; SILVA et al., 2006; RÖWERT-HUBER et al., 2007; ULRICH et al., 2007), entretanto, o mesmo não ocorre em medicina veterinária, apesar da elevada incidência destas doenças (ALMEIDA et al., 2001; PRONOVOST et al., 2004; TAMMENHAIN et al., 2008; FAVROT et al., 2009). É importante salientar que cães e humanos são expostos aos mesmos fatores de risco que podem culminar no desenvolvimento de ceratose actínica e CCE cutâneo. Logo, os cães são modelos apropriados para o estudo do comportamento biológico da ceratose actínica e do CCE cutâneo. De acordo com a literatura consultada, foi possível verificar que este estudo é a primeira pesquisa em cães com ênfase na avaliação de características clínicas, histopatológicas e imunoistoquímicas de forma comparativa entre a ceratose actínica e o CCE cutâneo.

Os cães das raças Dálmata, American Staffordshire Terrier, Beagle, Basset Hound e Bull Terrier apresentam predisposição a lesões actínicas (SCOTT et al., 2001). Entretanto, os cães da raça Pit Bull foram os mais acometidos neste estudo. Este dado corrobora com dados de autores brasileiros, que observaram alta incidência da ceratose actínica em cães desta mesma raça (TAMMENHAIN et al., 2008). GROSS et al. (2005) afirmaram que os cães da raça Pit Bull apresentam predisposição ao desenvolvimento de CCE cutâneo. Este dado coincide com o encontrado neste estudo, no qual estes animais representaram a maioria (6/10) dos cães afetados, seguidos pela raça Boxer, Dogo argentino e Terrier brasileiro.

A maior frequência de Pit Bulls pode ser explicada pelo aumento da população desta raça nos últimos anos somado a excessiva exposição ao sol relatada pelos proprietários. Esta última foi o principal fator de risco no desenvolvimento da ceratose actínica e do CCE cutâneo. Todos os cães avaliados possuíam pelame curto e de coloração branca, o que confirma a predisposição de animais com estas características citada por HARGIS et al. (1977) e GROSS et al. (2005). Essa predileção pode ser

justificada pela ausência das propriedades fotoprotetoras da melanina e pela redução da proteção da pele em vista do comprimento curto dos pêlos. Além disso, a maioria dos cães (8/10) apresentou dermatopatias crônicas, como piodermites, foliculites bacterianas e demodiciose. Estas afecções são acompanhadas por inflamação da pele. É possível que a inflamação cutânea crônica seja um fator de risco importante, conforme citado por ULRICH et al. (2007).

A média de idade dos cães acometidos por ceratose actínica e CCE cutâneo foi de 4,3 (±0,8) e 5,6 (±1,7) anos, respectivamente. Isso se contrapõe aos valores citados por GROSS et al. (2005), que afirmaram que as lesões ocorrem principalmente em cães mais velhos. Estes dados indicam que esta população sofreu uma exposição precoce aos fatores de risco, em especial à luz solar, resultando no desenvolvimento da doença ainda na fase adulto-jovem, o que pode culminar na redução na expectativa de vida destes cães.

O Laboratório Werner & Werner está situado em Curitiba-PR, o que explica o maior número de cães provenientes desta cidade. A latitude em Salvador-BA, Brasília, Jaboticabal/ Ribeirão Preto e Curitiba é de 12°S, 15°S, 21°S e 25°S, respectivamente. Em países do hemisfério norte, como Estados Unidos, a latitude varia de 30°N a 64°N na maior parte do país. A latitude baixa resulta em maior exposição à luz UVB, principal fator etiológico da ceratose actínica e do CCE cutâneo. LEBWOHL (2003) afirma que a ceratose actínica é mais comum em países de latitude baixa, onde a exposição à luz UVB pode ser o dobro da que ocorre em latitudes mais altas.

ALMEIDA et al. (2001) afirmaram que não existe predileção sexual para o desenvolvimento de CCE. Em ambos os grupos houve maior frequência de fêmeas em relação aos machos. A maioria das cadelas deste estudo foi castrada, mas não antes do 1° cio, logo esse dado não permite inferir informações importantes sobre a influência hormonal no desenvolvimento da ceratose actínica e do CCE cutâneo.

Apenas dois cães de cada grupo foram submetidos ao uso prolongado de prednisona, o que pode resultar em imunossupressão. Entretanto, não foi feito um estudo sobre a imunocompetência destes cães no presente estudo. Logo, não é possível inferir se a imunossupressão crônica foi um fator de risco nesses cães, como

estabelecido em humanos portadores de ceratose actínica, segundo ULRICH et al. (2007).

Em relação à ceratose actínica, as lesões dermatológicas foram variáveis. Alguns cães apresentavam eritema, pápulas, alopecia e descamação, conforme descrito por SCOTT et al. (2001). Nestes casos, além da ceratose actínica, outros diagnósticos diferenciais foram demodiciose, foliculite bacteriana primária e secundária e alergopatias. Os comedões foram frequentes, observados principalmente em região abdominal ventral e tórax lateral e nos casos em que a pele estava crostosa e cerótica.

Outros cães apresentaram quadros mais severos de ceratose actínica, caracterizados por piodermite superficial e profunda, com a presença de crostas, colaretes epidérmicos e pústulas, o que macroscopicamente lembrava pênfigo foliáceo. Este quadro clínico foi reconhecido também por PAPADOGIANNAKIS et al. (2008).

O cão n.02 apresentou evolução do quadro de ceratose actínica para CCE cutâneo três meses após o diagnóstico da primeira doença. Era uma cadela da raça Pit Bull com 5 anos de idade que apresentou ceratose actínica em região ventral e tórax lateral. A progressão de ceratose actínica para CCE observada neste caso corrobora os relatos de PAPADOGIANNAKIS et al. (2008) em um Dogo Argentino e de HARGIS et al. (1977) em 13 cães da raça Beagle, que concluíram que os cães desenvolveram a doença em circunstâncias que sugerem o envolvimento da radiação solar na patogênese, como é no homem.

Foram observadas lesões erosivas e também proliferativas nos casos de CCE cutâneo, de diversos tamanhos (0,5cm a 5cm de diâmetro). Os aspectos lesionais foram semelhantes aos descritos por WITHROW & MACEWEN (2007), que referiram que a lesão proliferativa pode adquirir aspecto de “couve-flor” e que a lesão erosiva tende a evoluir para uma úlcera profunda.

Além das principais regiões acometidas por ceratose actínica, conforme citado por GROSS et al. (2005), que incluem abdômen ventral, flanco e membros pélvicos, os cães apresentaram lesões também em bolsa escrotal, tórax lateral e em plano nasal. Em um estudo retrospectivo realizado em Curitiba-PR, o plano nasal foi o local mais frequente em cães da raça Pit Bull acometidos por ceratose actínica (TAMMENHAIN et

al., 2008), ao contrário deste estudo, no qual apenas dois cães foram afetados nesta região.

A maioria dos cães portadores de CCE cutâneo apresentou lesões em abdômen ventral, como citado por GROSS et al. (2005). Estes autores descrevem também o flanco como uma área comumente afetada, mas apenas um cão apresentou lesão nesta região.

Embora a região lateral do tórax não seja a mais comumente afetada por esses processos dérmicos, neste estudo optou-se pela coleta destas amostras para controle desta região, pois os animais viviam em canil com piso de plástico e apresentavam eritema discreto na pele da região abdominal ventral por contato com essa superfície.

Os achados histopatológicos encontrados nos cortes de ceratose actínica foram condizentes com os descritos por GROSS et al. (2005). Na epiderme observou-se hiperplasia, acompanhada por hiperceratose e/ou paraceratose. Estes autores descrevem a alteração da arquitetura normal, o que neste estudo foi evidenciado pela perda da polaridade dos ceratinócitos, pleomorfismo celular moderado e desorganização das camadas da epiderme.

Nos anexos cutâneos notaram-se folículos pilosos apresentando dilatação cística infundibular por hiperceratose e em alguns casos também haviam colônias bacterianas com proliferação de neutrófilos caracterizando uma infecção secundária, o que condiz com as afirmações de GROSS et al. (2005), de que a infecção bacteriana secundária é decorrente de comedões actínicos.

Nas amostras de G1, observou-se degeneração do colágeno no tecido conjuntivo frouxo localizado na derme e de fibras elásticas, evidenciando o quadro de elastose solar, o que admite o papel da injúria solar na etiologia da doença, uma vez que as alterações elastóticas na pele são consideradas o principal indicador de exposição solar cumulativa na derme (KLIGMAN & SAYRE, 1991). Em G2, 8/10 amostras apresentaram elastose solar associada ao CCE. A ausência desta alteração nas amostras n.17 e n.19 sustenta a possibilidade de que outro agente etiológico tenha causado o CCE nestes animais, como, por exemplo, o papilomavírus, que foi identificado em 9/42 amostras de CCE em cão, como assinalado por ZAUGG et al. (2005).

No grupo G2, 8/10 amostras eram CCE bem diferenciado e 2/10 eram CCE acantolítico. A menor frequência de CCE acantolítico observada neste grupo reforça a descrição de GROSS et al. (2005), que citaram que esta é uma variante histológica rara em cães e que o tipo bem diferenciado é o mais comum nesta espécie. Os principais achados histopatológicos encontrados nos CCEs cutâneo bem diferenciados coincidiram com os descritos por SCOTT et al. (2001).

Em medicina veterinária, fatores como invasão perineural ainda não foram estudados. GROSS et al. (2005) afirmaram que esse dado é importante, pois permitiria o estabelecimento de um prognóstico mais adequado, assim como uma melhor abordagem terapêutica. Esta característica foi pesquisada em todos os cortes e foi observada apenas na amostra n.17. A evolução da doença neste cão foi rápida (4 meses) e a lesão localizava-se em bolsa escrotal. Por ter sido apenas um animal, este dado não estabelece uma relação fidedigna com o prognóstico, como foi encontrado por VELAZQUEZ et al. (2008). Onde esses mesmos pesquisadores mostraram que 69% dos pacientes humanos que apresentaram invasão perineural desenvolveram metástase em linfonodo regional. Entretanto, é provável que a invasão perineural esteja relacionada a quadros mais agressivos e tumores localmente invasivos.

As amostras de CCE acantolítico exibiram áreas extensas de acantólise, sendo este padrão predominante. Estes achados ratificam os descritos por GROSS et al. (2005). A amostra n.15 chamou a atenção devido à presença de vaso linfático contendo êmbolo neoplásico, entretanto, até o momento, esta cadela não apresentou metástases em linfonodos, o que discorda do fator preditivo estabelecido por MARINHO et al. (2008), que observou uma relação positiva entre a invasão de vasos linfáticos e a ocorrência de metástases em tumores de mama em mulheres.

A reação imunoistoquímica não revelou variação na porcentagem de células marcadas para a atividade da COX-2 de acordo com o diagnóstico histopatológico, sendo a expressão de COX-2 nas amostras de ceratose actínica semelhante à observada nas amostras de CCE cutâneo. Não houve imunomarcação para COX-2 na pele normal, demonstrando que esta não foi expressa amostras de pele sem alterações histológicas. De forma coincidente, ALMEIDA et al. (2001) e PRONOVOST et al. (2004) não detectaram COX-2 em amostras de pele canina normal. A localização celular da

marcação foi semelhante à encontrada por ALMEIDA et al. (2001), que observaram imunomarcação difusa e inteiramente confinada ao citoplasma dos ceratinócitos, sendo evidente ao redor da membrana nuclear.

Houve intensa expressão de COX-2 nas amostras de G1, a qual permeou toda a epiderme hiperplásica. Neste estudo, há evidências de que a expressão tenha sido induzida pela exposição excessiva à radiação solar, o que condiz com os achados de BUCKMAN et al. (1998), que observaram aumento da expressão de COX-2 em ceratinócitos *in vitro* expostos a luz UVB. A expressão da COX-2 prejudica a diferenciação epidérmica. As principais razões para que isto aconteça são a expressão da própria enzima, seguida pela produção de prostaglandinas, o que resulta em hiperplasia da epiderme, refletindo um aumento no número de células e hiperceratose (NEUFANG et al., 2001). No atual estudo, estes dois achados foram alterações histológicas características da ceratose actínica, que clinicamente se manifestaram como pele ressecada e espessa.

Foi observada alta porcentagem de células marcadas e intensa expressão para a COX-2 nos ceratinócitos neoplásicos nas amostras de G2, assim como nas áreas de ceratose actínica na pele adjacente. Estes achados ratificam os encontrados por ALMEIDA et al. (2001), que observaram marcação intensa nos ceratinócitos neoplásicos em 40 amostras de CCE em cães. Observou-se imunomarcação apenas no componente epitelial da neoplasia, o que coincide com os resultados da pesquisa realizada por DE NARDI et al. (2005) em cadelas portadoras de carcinoma mamário, na qual não foi constatada nenhuma expressão nas células mesenquimais adjacentes ao tumor, apenas nas células epiteliais.

Os resultados deste estudo sugerem o envolvimento da COX-2 no desenvolvimento de tumores de pele provocados por exposição prolongada ao sol, conforme proposto por BUCKMAN et al. (1998). Nestes casos, é provável que a COX-2 promova o desenvolvimento tumoral atuando na angiogênese. NAGHSHVAR et al. (2008) afirmaram que existe uma importante relação entre a enzima COX-2 e os mastócitos presentes no infiltrado inflamatório peritumoral. GRÜTZKAU et al. (1998) concluíram que mastócitos não neoplásicos expressam VEGF. ORTONNE (2003)

também ressaltou a relação entre COX-2 e VEGF e, da mesma forma, afirmou que esta enzima tem a capacidade de elevar a expressão do VEGF.

Além disso, a elevada expressão de COX-2 pode resultar na resistência dos ceratinócitos à apoptose. SUBBARAMAIAH et al. (1999) especularam que os mecanismos pelos quais possa ocorrer inibição da apoptose sejam a presença de uma proteína associada a apoptose, chamada nucleobindina, ou a modulação intracelular de ácido araquidônico. Somado a isto, FISCHER (1997) afirmou que o aumento na síntese de PGE_2 pela COX-2 provoca a redução da resposta imune do hospedeiro, dificultando assim a eliminação de células neoplásicas.

Os dados obtidos neste estudo apontam para o uso racional de inibidores seletivos de COX-2 no tratamento de cães com ceratose actínica e CCE cutâneo, como tentativa de reduzir os efeitos deletérios provocados pela expressão da COX-2 em resposta à injúria solar. A possível ação preventiva e terapêutica de antiinflamatórios em cães portadores de ceratose actínica e do CCE cutâneo possui implicações clínicas e, se confirmada, pode auxiliar no controle dessas doenças.

A localização celular e a distribuição da marcação do anticorpo MIB-1 foram semelhantes às encontradas por LAPRIE et al. (2001) em amostras de melanoma canino, sendo inteiramente confinada aos núcleos dos ceratinócitos e caracterizada por uma coloração acastanhada. Os autores acima citados também perceberam marcação difusa em algumas amostras e focal em agregados de células tumorais.

A epiderme do cão possui cinco camadas, sendo a camada basal a mais interna (SCOTT et al., 2001). À medida que ocorre diferenciação dos ceratinócitos em direção à camada córnea, estas células tendem a perder os núcleos, o que justifica a presença de células em divisão principalmente nas camadas basal e escamosa.

O principal achado histológico que diferencia a ceratose actínica do CCE cutâneo é a invasão da membrana basal por células neoplásicas. Porém, segundo OH & PENNEYS (2004) a identificação desta característica pode ser difícil em amostras nas quais a membrana não seja facilmente delimitada por razões como corte fragmentado, presença de infiltrado inflamatório intenso e amostra não representativa. Logo, a distinção histológica entre a ceratose actínica e o início do CCE cutâneo apresenta

controvérsias entre dermatopatologistas veterinários e médicos. OH & PENNEYS (2004) identificaram padrões distintos de marcação da proteína Ki-67 em amostras de ceratose actínica e CCE cutâneo de pacientes humanos, que podem ser utilizados para diferenciar estas duas doenças quando o exame histopatológico não for conclusivo. Estes dados divergem dos encontrados no presente estudo, no qual os padrões de marcação na ceratose actínica e no CCE cutâneo foram semelhantes, a porcentagem de células marcadas não variou de acordo com a classificação histopatológica e não houve diferença estatística entre G1 e G2, mas entre esses e G0 ($p>0,05$).

O IM baseou-se na contagem de figuras de mitose presentes na lâmina corada por H.E. A contagem das figuras de mitose pode auxiliar o patologista a estimar a taxa de proliferação celular durante a interpretação do exame histopatológico. Esta técnica apresenta vantagens, como baixo custo e maior facilidade de execução, quando comparado ao Ki-67, que requer tempo e técnicas de coloração especial.

Em G1, o IM médio da amostra n.10 foi 7 e a lesão localizava-se em plano nasal. De acordo com MULAS et al. (1999), lesões nesta região, associadas à dermatite solar, podem ter um comportamento maligno. Nas demais amostras não houve relação do IM com a localização da lesão, taxa de recidiva e remissão completa da doença, o que ratifica os dados expostos por SPANGLER & KASS (2006), que não conseguiram estabelecer um modelo preditivo satisfatório com o uso de IM em cães portadores de neoplasias melanocíticas.

A presença de figuras de mitose atípicas, somada às outras alterações histopatológicas, clínicas e imunoistoquímicas tornam evidentes as semelhanças entre a ceratose actínica e o CCE cutâneo e permitem sugerir que ambos correspondem a mesma doença, mas em fases distintas, conforme já citado por outros autores (LEBWOHL, 2003; RÖWERT-HUBER et al.,2007). GROSS et al. (2005) citaram que a relutância em trocar a terminologia da ceratose actínica deve-se, em grande parte, ao impacto psicológico que a palavra “carcinoma” pode provocar nos proprietários dos animais.

As fases de metáfase, anáfase e telófase foram identificadas nas amostras de CCE cutâneo em figuras de mitose típicas. Porém, em G2, 7/10 amostras apresentaram

número maior de figuras de mitose atípicas do que típicas, caracterizadas por aumento do tamanho, assimetria e desorganização nuclear, o que sugere dano genético, segundo ANKLE et al. (2007). Não houve relação do IM com a localização da lesão, taxa de recidiva e remissão completa da doença em G2, o que corrobora os achados de SARLI et al. (2002), nos quais o IM não foi útil como marcador prognóstico em tumores mamários em cadelas. Ressalta-se também que o IM médio de G2 foi inferior ao encontrado por MULAS et al. (1999), que utilizaram o mesmo método de contagem em amostras de CCE cutâneo em cão e obtiveram IM médio de 9,5 (±9,1).

Em pesquisa realizada por KUNTZ et al. (1997) houve relação entre o IM e a ocorrência de metástases em sarcomas de tecidos moles em cães, o que não fora evidenciado no presente estudo, no qual apenas um cão apresentou possível metástase, caracterizada por um nódulo em cérebro diagnosticado por ressonância magnética e o IM desse animal foi 6.

Adicionalmente, o IM, assim como o Ki-67, demonstrou que o comportamento biológico da ceratose actínica é bastante similar ao do CCE cutâneo, o que sugere que esta não seja uma lesão pré-neoplásica, mas sim a fase inicial do CCE. Não houve correlação entre o IM e a imunomarcação para Ki-67, o que pode ser explicado pelo fato do IM ter sido avaliado em lâminas coradas por H.E., pois ANKLE et al. (2007) concluíram que a coloração cristal violeta 1% possibilita melhor identificação de figuras de mitose do que a coloração H.E..

ORTONNE (2003) concluiu que a expressão da COX-2 após exposição solar prolongada foi acompanhada pela elevação da proliferação de ceratinócitos, discordante do presente estudo, onde não se encontrou correlação entre a expressão de COX-2 e o índice de proliferação celular dos ceratinócitos (r=0,32). NEUFANG et al. (2001) citaram que a proliferação induzida pela COX-2 foi resultado de uma diferenciação epidérmica prejudicada e não por um aumento na taxa de proliferação, o que foi demonstrado pela supressão da marcação de ceratina 10, involucrina e loricrina em células suprabasais. Essa é uma hipótese para a ausência de correlação entre essas duas variáveis observadas no presente estudo, mas requer outras investigações para ser confirmada ou descartada.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ✓ Não há correlação entre a proliferação celular e a expressão da COX-2 na ceratose actínica e no CCE cutâneo em cães.

- ✓ Os cães da raça Pit Bull apresentam freqüência elevada de ceratose actínica e CCE cutâneo.

- ✓ Não há relação entre o índice de proliferação celular, a expressão de COX-2 e o prognóstico de cães acometidos por ceratose actínica e CCE cutâneo.

- ✓ O CCE bem diferenciado é a variante histológica mais comum na espécie canina.

- ✓ A ceratose actínica se comportou de forma semelhante ao CCE cutâneo.

8. REFERÊNCIAS[1]

ALAM, M.; RATNER, D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, New York, v. 344, n. 13, p. 975-983, 2001.

AL-DISSI, A. N.; HAINES, D. M.; SINGH, B.; KIDNEY, B. A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor associated with tumor cell proliferation in canine cutaneous squamous cell carcinomas and trichoepitheliomas. **Veterinary Pathology**, Saskatoon, v. 44, n. 6, p. 823-830, 2007.

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

ANKLE, M. R.; KALE, A. D.; CHARANTIMATH, S. Comparison of staining of mitotic figures by haematoxylin and eosin-and crystal violet stains, in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Indian Journal of Dental Research**, Nehru Nagar, v. 18, n. 3, p. 101-105, 2007.

AYALA, G. E.; DAI, H.; ITTMANN, M.; LI, R.; POWELL, M.; FROLOV, A.; WHEELER, T. C.; THOMPSON, T. C.; ROWLEY, D. Growth and survival mechanisms associated with perineural invasion in prostate cancer. **Cancer Research**, Houston, v. 64, n. 17, p. 6082-6090, 2004.

BAKHLE, Y. S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 134, n. 6, p. 1137-1150, 2001.

[1] ABNT – NBR 6023 ago. 2002

BARNHILL, R. L.; KATZEN, J.; SPATZ, A.; FINE, J.; BERWICK, M. The importance of mitotic rate as a prognostic factor for localized cutaneous melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, Washington, v. 32, n. 4, p. 268-273, 2005.

BERHANE, T.; HALLIDAY, G. M.; COOKE, B.; BARNETSON, R. S. C. Inflammation is associated with progression of actinic keratoses to squamous cell carcinomas in humans. **British Journal of Dermatology**, Sidney, v. 146, n. 5, p. 810-815, 2002.

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

BIESTERFELD, S.; REITMAIER, M. Re-evaluation of prognostic mitotic figure counting in breast cancer: results of a prospective clinical follow-up study. **Anticancer Research**, Pauwelsstrasse, v. 21, n. 1B, p. 589–594, 2001.

BUCKMAN, S. Y.; GRESHAM, A.; HALE, P.; HRUZA, G.; ANAST, J.; MASFERRER, J.; PENTLAND, A. P. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implications for the development of skin cancer. **Carcinogenesis**, St. Louis, v. 19, n. 5, p. 723-729, 1998.

CARPENTER, P. M.; LINDEN, K. G.; McLAREN, C. E.; LI, K-T.; ARAIN, S.; BARR, R. J.; HITE, P.; SUN, J. D.; MEYSKENS Jr, F. L. Nuclear morphometry and molecular biomarkers of actinic keratosis, sun-damaged, and nonexposed skin. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Orange, v. 13, n. 12, p. 1996-2002, 2004.

CHO, C. G.; JO, H. Y.; CHOI, H. C.; KIM, I. H.; SONG, H. J.; OH, C. H. A study of the solar effect on actinic keratoses by quantification of elastic fibres using an image analysis system. **Acta Dermato-Venerealogica**, Seoul, v. 79, n. 4, p. 278-280, 1999.

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

DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R.; SOUZA, C. H. M.; AMORIN, R. L.; RODASKI, S.; CALDERON, C.; TORRES, R. Cyclooxygenase-2 expression in mammary tumors in dogs and its correlation to histologic and biologic behavior. **Veterinary and Comparative Oncology**, Kansas, v. 3, n. 1, p. 56-57, 2005.

DINEHART, S. M.; CHU, D. Z.; MANERS, A. W.; POLLACK, S. V. Immunosuppression in patients with metastatic squamous cell carcinoma from the skin. **The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology**, Little Rock, v. 16, n. 3, p. 271-274, 1990.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, St. Hyacinthe, v. 40, n. 2, p. 207-212, 2003.

ENDL, E.; GERDES, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. **Experimental Cell Research**, Borstel, v. 257, n. 2, p. 231-237, 2000.

FAVROT, C.; WELLE, M.; HEIMANN, M.; GODSON, D. L.; GUSCETTI, F. Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. **Veterinary Pathology**, Zurich, v. 46, n. 1, p. 25-33, 2009.

FISCHER, S. M. Prostaglandins and cancer. **Frontiers in Bioscience**, Smithville, v. 2, p. 482-500, 1997.

FOSSLIEN, E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, Chicago, v. 30, n. 1, p. 3-21, 2000.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, Hospitalstrasse, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

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

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis.** Oxford: Blackwell, 2005. 932 p.

GRÜTZKAU, A.; KRÜGER-KRASAGAKES, S.; BAUMEISTER, H.; SCHWARZ, C.; KÖGEL, H.; WELKER, P.; LIPPERT, U.; HENZ, B. M.; MÖLLER, A. Synthesis, storage, and release of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) by human mast cells: implications for the biological significance of $VEGF_{206}$. **Molecular Biology of the Cell**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 875–884, 1998.

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

HELLER, D. A.; CLIFFORF, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; SHOFER, F. S.; SMITH, A.; SORENMO, K. U. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology**, Philadelphia, v. 42, n. 6, p. 776 - 780, 2005.

HOWE, R. L. Inflammation and breast cancer. Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 210 – 219, 2007.

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

JOO, Y-E.; CHUNG, I-J.; PARK, Y-K; KOH, Y-S; LEE, J-H.; PARK, C-H. LEE, W-S.; KIM, H-S.; CHOI, S-K.; REW, J-S.; PARK, C-S.; KIM, S-J. Expression of cyclooxygenase-2,

p53 and ki-67 in gastric cancer. **Journal of Korean Medical Science**, Gwangju, v. 21, n. 5, p. 871-876, 2006.

KAMOI, S.; OHAKI, Y.; OKADA, S.; MATSUSHITA, N. KAWAMURA, T.; ARAKI, T. Mitotic index and Ki-67 nuclear antigen labeling index as predictors of chemotherapy response in uterine cervical carcinoma. **Gynecologic Oncology**, Chiba, v. 83, n. 3, p. 555–559, 2001.

KIYOKAZU, O.; TETSUSHI, Y.; KOJI, N.; ISAO, N. Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. **Journal of Veterinary Medical Science**, Hirakata, v. 69, n. 11, p. 1117-1121, 2007.

KLEITER, M.; MALARKEY, D. E.; RUSLANDER, D. E.; THRALL, D. E. Expression of cyclooxygenase-2 in canine epithelial nasal tumors. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, Raleigh, v. 45, n. 3, p. 255-260, 2004.

KLIGMAN, L. H.; SAYRE, R. M. An action spectrum for ultraviolet induced elastosis in hairless mice: quantification of elastosis by image analysis. **Photochemistry and Photobiology**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 237-242, 1991.

KUNTZ, C. A.; DERNELL, W. S.; POWERS, B. E.; DEVITT, C.; STRAW, R. C.; WITHROW, S. J. Prognostic factors for surgical treatment of soft-tissue sarcomas in dogs: 75 cases (1986-1996). **Journal of American Veterinary Medical Association**, Fort Collins, v. 211, n. 9, p. 1147-1151, 1997.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M-F.; NET, J-L. L. E.; LAGADIC, M.; DELVERDIER, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**, Toulouse, v. 12, n. 3, p. 139-147, 2001.

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

MARINHO, V. F. Z.; METZE, K.; SANCHES, F. S. F.; ROCHA, G. F. S.; GOBBI, H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, p. 203-207, 2008.

MORTIER, L.; MARCHETTIA, P.; DELAPORTE, E.; LASSALLEC, E. M.; THOMAS, P.; PIETTE, F.; FORMSTECHER, P.; POLAKOWSKAA, R.; DANZÉA, P-M. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the $p16^{INK4a}$ tumor suppressor. **Cancer Letters**, Place de Verdun, v. 176, n. 2, p. 205-214, 2002.

MULAS, J. M.; MILLAN, Y.; RUIZ-VILLAMOR, E. BAUTISTA, M. J.; ROLLON, E.; MONTEROS, A. E. Apoptosis and mitosis in tumours of the skin and subcutaneous tissues of the dog. **Research in Veterinary Science**, Córdoba, v. 66, n. 2, p. 139-146, 1999.

MUNDAY, J. S.; KIUPEL, M.; FRENCH, A. F.; HOWE, L.; SQUIRES, R. A. Detection of papillomaviral sequences in feline Bowenoid in situ carcinoma using consensus primers. **Veterinary Dermatology**, Palmerston North, v. 18, n. 4, p. 241-245, 2007.

NAGHSHVAR, F.; TORABIZADEH, Z.; EMADIAN, O.; KHALILIAN, A.; MALEKI, I.; ENAMI, K. Correlation of cyclooxygenase 2 (Cox-2) presentation and inflammatory cells infiltration in colorectal cancer: a histopathological and immunohistochemical study. **Research Journal of Biological Sciences**, Mazandaran, v. 3, n. 8, p. 916-918, 2008.

NEUFANG, G.; FÜRSTENBERGER, G.; HEIDT, M; MARKS, F.; MÜLLER-DECKER, K. Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing

cyclooxygenase-2 in skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Heidelberg, v. 98, n. 13, p. 7629-7634, 2001.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. Canine papillomavirus - A centenary review. **Journal of Comparative Pathology**, Cambridge, v. 120, n. 3, p. 219-233, 1999.

OH, C. W.; PENNEYS, N. P27 e MIB-1 expression in actinic keratosis, bowen disease, and squamous cell carcinoma. **The American Journal of Dermatopathology**, Chinju, v. 26, n. 1, p. 22-26, 2004.

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

ORTONNE, J-P. Anti-inflammatory vs. inflammatory treatments for actinic keratoses. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Nice, v. 2, n.3-4, p. 135-140, 2003.

PAPADOGIANNAKIS, E.; KONTOS, V.; FRANGIA, K. A case of canine squamous cell carcinoma secondary to solar keratosis (actinic carcinoma in situ). **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, Athens, v. 59, n. 1, p. 64-70, 2008.

PRONOVOST, N.; SUTER, M. M.; MUELLER, E.; SIROIS, J.; DORÉ, M. Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic canine keratinocytes. **Veterinary and Comparative Oncology**, St. Hyacinthe, v. 2, n. 4, p. 222-233, 2004.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, Copenhagen, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

RIGEL, D. S.; RIGEL, E. G.; RIGEL, A. C. Effects of altitude and latitude on ambient UVB radiation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, New York, v. 40, n. 1, p. 114-116, 1999.

RISHIKESH, M. K.; SADHANA, S. S. Prostaglandins and cyclooxygenase: their probable role in cancer. **Indian Journal of Pharmacology**, Matunga, v. 35, n. 1, p. 3-12, 2003.

RODIN, A. E.; LARSON, D. L.; ROBERTS, D. K. Nature of the perineural space invaded by prostatic carcinoma. **Cancer**, Galveston, v. 20, n. 10, p. 1772-1779, 1967.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 prolieration markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, Merelbeke, v. 121, n. 1, p. 13-24, 1999.

ROMANSIK, E. M.; REILLY, C. M.; KASS, P. H.; MOORE, P. F.; LONDON, C. A. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, California, v. 44, n. 3, p.335-341, 2007.

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

SARLI, G.; PREZIOSI, R.; BENAZZI, C.; CASTELLANI, G.; MARCATO, P. S. Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Bologna, v. 14, n. 1, p. 25-34, 2002.

SAWAOKA, H.; TSUJI, S.; TSUJI, M.; GUNAWAN, E. S.; SASAKI, Y.; KAWANO, S.; HORI, M. COX inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth *in vivo*. **Laboratory Investigation**, Suita, v. 79, n. 12, p. 1469-1477, 1999.

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

SCOTT, D.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology.** 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528p.

SILVA, T. A.; COELHO, G.; BOCCA, A. L.; CAVALCANTE NETO, F. F. Expression of apoptotic, cell proliferation regulatory, and structural proteins in actinic keratosis and their association with dermal elastosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, Distrito Federal, v. 34, n. 4, p. 315-323, 2006.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, California, v. 43, n. 2, p. 136-149, 2006.

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

STOCKFLETH, E.; ULRICH, C.; MEYER, T.; CHRISTOPHERS, E. Epithelial malignancies in organ transplant patients. Clinical presentation and new methods of treatment. **Recent Resuls in Cancer Research**, Kiel, v. 160, p.251-258, 2002.

SUBBARAMAIAH, K.; ALTORKI, N.; CHUNG, W. J.; MESTRE, J. R.; SAMPAT, A.; DANNENBERG, A. J. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 274, n. 16, p. 10911-10915, 1999.

TAMMENHAIN, B.; FARIAS, M. R.; OBLADEN, A.; WERNER, J. Estudo retrospectivo da dermatite actínica em cães da raça pit bull terrier. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 29., 2008, Maceió. **Anais...**, p.1-3.

TSUJII, M.; DUBOIS, R.N. Alteration in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, Nashville, v. 83, n. 3, p. 493-501, 1995.

ULRICH, M.; MALTUSCH, A.; RÖWERT-HUBER, J.; GONZÁLEZ, S.; STERRY, W.; STOCKFLETH, E.; ASTNER, S. Actinic keratoses: non-invasive diagnosis for field cancerisation. **British Journal of Dermatology**, Berlin, v. 156, suppl. 3, p. 13-17, 2007.

UNNA, P. G. **The histopathology of the skin**. New York: Macmillan, 1896, 836 p.

VELAZQUEZ, E. F.; AVALA, G.; LIU, H.; CHAUX, A.; ZANOTTI, M.; TORRES, J.; CHO, S. I.; BARRETO, J. E.; SOARES, F.; CUBILLA, A. L. Histologic grade and perineural invasion are more important than tumor thickness as predictor of nodal metastasis in penile squamous cell carcinoma invading 5 to 10 mm. **American Journal of Surgical Pathology**, Boston, v. 32, n. 7, p. 974-979, 2008.

WALDER, E. J. Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer. **Clinics in Dermatology**, California, v. 13; n. 6, p. 569-578, 1995.

WEBSTER, J. D. Evaluation of prognostic markers for canine mast cell tumors treated with vinblastine and prednisone. **BMC Veterinary Research**, East Lansingg, v. 4, p. 32, 2008.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; MILLER, R. A.; KANEENE, J. B.; KIUPEL, M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication**. Veterinary Pathology**, East Lansing, v. 44, n. 3, p.298-308, 2007.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & Macewen`s Small Animal Oncology**. 4.ed. St. Louis: Saunders, 2007. 846 p.

ZAUGG, N.; NESPECA, G.; HAUSER, B.; ACKERMANN, M.; FAVROT, C. Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and *in situ* squamous cell carcinoma. **Veterinary Dermatology**, Switzerland, v. 16, n. 5, p. 290-298, 2005.

ZUCCARI, D. A. P. C.; PAVAM, M. V.; TERZIAN, A. C. B.; PEREIRA, R. S.; RUIZ, C. M.; ANDRADE, J. A. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factores and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São José do Rio Preto, v. 28, n. 4, p. 207-215, 2008.

9. ANEXOS

Anexo 1

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA:

Soluções tampão utilizadas na recuperação antigênica

Citrato 10mM:
- 1000 mL de água destilada
- 2,1g de ácido cítrico monohidratado de peso molecular 192.13
- pH 6,0 (ajustar em medidor com hidróxido de sódio hipersaturado)

TRIS solução tampão:
- 1000 mL de água destilada
- 6,0g de Trizma base
- 8,5g cloreto de sódio
- pH 7,4 (pode variar entre 7,2 e 7,6. É ajustado em medidor com ácido clorídrico)

Solução utilizada no bloqueio da peroxidase endógena

Metanol com água oxigenada:
- 190 mL de álcool metílico
- 10 mL de água oxigenada 10 volumes

Anexo 2

DADOS CLÍNICOS DOS CÃES ACOMETIDOS POR CERATOSE ACTÍNICA

Animal n°01

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Piodermite
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	> 1 ano
Localização da lesão:	Abdome ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°02

Raça:	Pit Bull
Idade:	5 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca e comida caseira
Tempo de evolução da doença:	20 dias
Localização da lesão:	Abdômen ventral e tórax lateral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°03

Raça:	Pit Bull
Idade:	3 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Não castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	1 ano e 6 meses
Localização da lesão:	Abdômen ventral e flanco
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°04

Raça:	Dogue Alemão
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Arlequim
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	1 semana
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Não
Remissão completa:	Sim

Animal n°05

Raça:	Boxer
Idade:	6 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Chácara
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrado
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Não informado
Tempo de evolução da doença:	1 ano
Localização da lesão:	Membro pélvico e bolsa escrotal
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°06

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Sim, esporadicamente
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	2 anos
Localização da lesão:	Membro pélvico e abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°07

Raça:	Dogo Argentino
Idade:	4 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Sim
Uso de prednisona:	Sim, por 30 dias
Status reprodutivo:	Não castrado
Dermatopatias crônicas:	Furunculose e hipotireoidismo
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	2 anos
Localização da lesão:	Flanco e plano nasal
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Sim

Animal n°08

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não informado
Status reprodutivo:	Não castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca e comida caseira
Tempo de evolução da doença:	2 meses
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Sim

Animal n°09

Raça:	Boxer
Idade:	4 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Apartamento
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Sim, por alguns meses
Status reprodutivo:	Castrado
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	4 meses
Localização da lesão:	Flanco e bolsa escrotal
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°10

Raça:	Bull Terrier
Idade:	5 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Não informada
Tempo de evolução da doença:	3 anos
Localização da lesão:	Tórax lateral e flanco
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Anexo 3

DADOS CLÍNICOS DOS CÃES ACOMETIDOS POR CCE CUTÂNEO

Animal n°11

Raça:	Terrier Brasileiro
Idade:	5 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Tricolor
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Sim, por 1 semana
Status reprodutivo:	Não informado
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	2 anos
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°12

Raça:	Dogo Argentino
Idade:	5 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	4 anos
Localização da lesão:	Plano nasal e membro torácico
Recidiva:	Não informado
Remissão completa:	Não informado

Animal n°13

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca e comida caseira
Tempo de evolução da doença:	4 meses
Localização da lesão:	Abdômen ventral e dorso
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°14

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca e pão
Tempo de evolução da doença:	6 meses
Localização da lesão:	Tórax lateral e membro pélvico
Recidiva:	Não informado
Remissão completa:	Não informado

Animal n°15

Raça:	Pit Bull
Idade:	4 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Sim, por 6 meses
Status reprodutivo:	Não castrada
Dermatopatias crônicas:	Sim
Alimentação:	Ração comercial seca e pão
Tempo de evolução da doença:	1 ano
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°16

Raça:	Pit Bull
Idade:	6 anos
Sexo:	Fêmea
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Sim, por 5 meses
Status reprodutivo:	Castrada
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	2 anos
Localização da lesão:	Tórax lateral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°17

Raça:	Boxer
Idade:	6 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não informado
Status reprodutivo:	Castrado (tratamento)
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca e comida caseira
Tempo de evolução da doença:	4 meses
Localização da lesão:	Bolsa escrotal
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°18

Raça:	Pit Bull
Idade:	10 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Desconhecido
Uso de prednisona:	Não informado
Status reprodutivo:	Não informado
Dermatopatias crônicas:	Demodiciose e piodermite recorrente
Alimentação:	Não informada
Tempo de evolução da doença:	Não informado
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°19

Raça:	Pit Bull
Idade:	6 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branco
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não informado
Status reprodutivo:	Castrado
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Não informada
Tempo de evolução da doença:	Não informado
Localização da lesão:	Abdômen ventral
Recidiva:	Sim
Remissão completa:	Não

Animal n°20

Raça:	Dogo Argentino
Idade:	6 anos
Sexo:	Macho
Cor da pelagem:	Branca
Ambiente:	Casa
Exposição excessiva ao sol:	Sim
Histórico familiar semelhante:	Não
Uso de prednisona:	Não
Status reprodutivo:	Não castrado
Dermatopatias crônicas:	Não
Alimentação:	Ração comercial seca
Tempo de evolução da doença:	2 meses
Localização da lesão:	Abdômen ventral, flanco e axila
Recidiva:	Não informado
Remissão completa:	Não informado