

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CORRELAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS AVALIAÇÕES DA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR PELOS MÉTODOS DE AgNORs E  
EXPRESSÃO DE Ki-67, DO ÍNDICE APOPTÓTICO PELA  
EXPRESSÃO DE CASPASE-3 E DA EXPRESSÃO DA p53 NO  
SARCOIDE EQUINO

ARITA DE CÁSSIA MARELLA CREMASCO

BOTUCATU, 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CORRELAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS AVALIAÇÕES DA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR PELOS MÉTODOS DE AgNORs E  
EXPRESSÃO DE Ki-67, DO ÍNDICE APOPTÓTICO PELA  
EXPRESSÃO DE CASPASE-3 E DA EXPRESSÃO DA p53 NO  
SARCOIDE EQUINO

ARITA DE CÁSSIA MARELLA CREMASCO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia,  
Universidade Estadual Paulista “Julio  
de Mesquita Filho” - UNESP, Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
mestre em Medicina Veterinária, Área  
de Patologia Animal.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Julio Lopes  
Sequeira

BOTUCATU, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Cremasco, Arita de Cássia Marella.

Correlações clínico-patológicas das avaliações da proliferação celular pelos métodos de AgNORs e expressão de Ki-67, do índice apoptótico pela expressão de caspase-3 e da expressão da p53 no sarcoide equino / Arita de Cássia Marella Cremasco. – Botucatu : [s.n.], 2011

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Julio Lopes Sequeira

Capes: 50503006

1. Equino - Doenças. 2. Pele - Tumores - Diagnóstico. 3. Patologia veterinária. 4. Oncologia Veterinária.

Palavras-chave: Oncologia; Patologia; Pele; Sarcoide equino.

Arita de Cássia Marella Cremasco

CORRELAÇÕES CLÍNICO-PATOLÓGICAS DAS AVALIAÇÕES DA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR PELOS MÉTODOS DE AgNORs E  
EXPRESSÃO DE Ki-67, DO ÍNDICE APOPTÓTICO PELA EXPRESSÃO DE  
CASPASE-3 E DA EXPRESSÃO DA p53 NO SARCOIDE EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira  
Presidente e Orientador  
Departamento de Clínica Veterinária  
FMVZ – UNESP - BOTUCATU

---

Prof. Dra. Sara Maria de Carvalho e Suzano  
Membro  
UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Hussni  
Membro  
Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP - BOTUCATU

Botucatu, 19 de Julho de 2011.

*Aos meus pais, Ari Francisco Cremasco e,  
Rita de Cássia Azevedo Marella Cremasco.*

*Aos meus irmãos, Ari Francisco Cremasco Filho e,  
Arian Francisco Marella Cremasco.  
À Marcela Castilho e Ariela Cremasco.*

*À querida companheira,  
Ingra.*

*Ao meu avô Harley Marella e a minha avó,  
Renée Azevedo Marella (in memoriam).*

*Ao professor Dr. Enio Pedone Bandarra (in memoriam).*

***DEDICO.***

“DAÍ-ME UM POVO QUE ACREDITA NO AMOR, E VEREIS A FELICIDADE  
SOBRE A TERRA.” (Gandhi).

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa e auxílio financeiro concedidos, acreditando em Nosso trabalho.

Aos animais.

"O Senhor disse, que Deus deu a faculdade da razão aos Homens, para que pudessem encontrar as coisas por si mesmos; mas Ele deu conhecimento aos animais... que foi muito mais útil e perfeito à sua maneira, e que lhes têm servido frequentemente para salvar a vida de pessoas." (Anna Sewell).

A família Marella Cremasco.

Ao Rodrigo Garcia Motta e família.

Ao Octávio Scalon Neto e família.

Ao companheirismo Rodolfo Françon, Márcia Moleta Colodel, Marcela Marcondes P. Rodrigues, Rafael Torres Neto e Pedro Pinczowski. Grata, Amigos.

Às pessoas Dra. Renée Laufer Amorim, Dra. Noeme Sousa Rocha e Eliana Rodrigues. Aos professores Dr. Antonio Carlos Paes e Dr. Carlos Alberto Hussni.

Aos amigos, especiais, que nos passam, com experiência e grande força: Maury Raul, Seu Noel, Claudinei, Valeria e Zé Carlos.

A pós-graduação nas Pessoas: José Roberto, Patrícia e Maria.

A Todos os funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Aos pós-graduandos pelo convívio e participação: Nicole e Malu (Acupuntura), Vitor Rosseto (Cirurgia), Rafael Grobério (Parasitologia), Raquel, Mari, Isabele, Fabrizio, Lidi, Tici, Thais e Tais (Patologia e Ornitopatologia).

Aos estagiários, que me ajudaram na recuperação das fichas diagnósticas, Aline Alvarenga, Claudenice Barros, e aos alunos da Faculdade de Garça - SP.

Às amigas Kelmy Melare, Gabriela's e Marina Gimeno. Ao amigo Freddi Bardela de Souza. A irmã Luciana Neves Torres, eterna admiração.

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da FMB, Samuel, Arthur e Eduardo e, tantas outras Pessoas que nos ajudam tanto. Um sorriso, um olhar, um gesto, uma palavra, um carinho que oferecemos a um ser, não a um diagnóstico. A compaixão, a segurança, o Amor, a confiança, o entendimento, a Resposta e a Compreensão, carregados no coração. Somos o meio.

Aos profissionais: Camila Dias Porto, Ana Paula Batista Masseno e Osimar de Carvalho Sanches.

A professora Ass. Dra. Carla Adriene da Silva Franchi do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP.

A professora Ass. Dra. Luzia Aparecida Trinca do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu-SP.

Ao meu orientador Prof. Ass. Dr. Julio Lopes Sequeira, a Pessoa que me permitiu essa oportunidade, envolvendo incontáveis aprendizados para o crescimento pessoal de ambos e profissionais a mim, de grande e indefinível colaboração nesta etapa da minha Vida e de quem quer que seja neste momento, a quem realmente é um patologista. Obrigada pela confiança no meu trabalho desde a primeira vez que eu pedi a sua mão para esta ajuda, a atenção tão forte e necessária quando voltadas a mim, sob aspectos evolutivos a serem considerados onde tivemos que encontrar um modo de comunicação. A pessoa que me ofereceu por entrega, tanto sobre a minha pessoa, de sua maneira correta e indiscutivelmente justa. O professor escolhido para driblar os meus momentos cíclicos e cegos, e os momentos não corretos e racionais. Agradeço.

“As coisas que queremos e parecem impossíveis, só podem ser conseguidas com uma teimosia pacífica.” (Gandhi).

A tudo o que se pode aprender com a convivência. Escolhem-se as maneiras e a postura a adotar, perante o mundo. Ou, conseguimos observar e buscar a compreensão no instante, ou permaneceremos no silêncio do conhecimento; é aqui e é neste instante, que se aprende, estando abertos a isso, à percepção correta; à sabedoria, caso contrário, não nos são reveladas e não nos revelamos as Nossas dificuldades, muitas vezes, pormenores, porém, que bastam ser reconhecidas para serem superadas. Cada qual vê no outro o que carrega no próprio coração. Corrompendo a indiferença moral, encontramos Gente de Verdade, esperança e bom astral. Compaixão.

Agradeço à Vida e a Todos aqueles que possuem um ideal de Justiça e de Amor ao próximo. A adversidade, é uma das razões de estarmos Todos aqui, se fôssemos perfeitos não seria preciso.

A Todos esses grandes Mestres presentes em Nossas Vidas.

*GRATIDÃO.*

“Conhecimento verdadeiro de si próprio só é dado ao ser humano; quando ele desenvolve interesse afetuoso para com os outros; Conhecimento verdadeiro do mundo o ser humano só alcança, quando ele procura compreender seu próprio ser.”

Rudolf Steiner.

Estudos de empatia e altruísmo, tanto em animais como humanos, sugerem que ao nos colocarmos mentalmente no lugar de um indivíduo com determinada dor, somos mais capazes de distinguir e entender o sofrimento alheio. Pessoas com baixo nível de empatia ignoram esse tipo de “dica não-verbal” e não correspondem à expectativa do outro.

(Estudos da compaixão -Allman et al., 2011).

Para aqueles que queiram acordar, boa viagem, para os que preferem ainda não mudar de opinião, boa viagem também... Muitos desses pacientes poderiam se curar a partir do momento que tivermos uma Medicina que leva em consideração o Ser Integral: mente, corpo e espírito.

(Dr. Sergio Felipe de Oliveira).

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos tipos clínicos de sarcoide equino segundo KNOTTENBELT (2005).....	13
Quadro 2 - Critérios morfológicos utilizados no sarcoide equino, de acordo com MARTENS et al. (2000).....	14
Quadro 3 - Anticorpos primários e suas respectivas diluições para marcação imuno-histoquímica nas amostras de sarcoide equino.....	16

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição por raça dos animais com sarcoide equino.....	22
Tabela 2 - Sexo dos animais portadores de sarcoide equino.....	22
Tabela 3 - Faixas etárias dos animais portadores de sarcoide equino.....	22
Tabela 4 - Pelagem dos animais portadores de sarcoide equino.....	22
Tabela 5 - Localização anatômica das amostras de sarcoide equino.....	23
Tabela 6 - Tamanho das tumorações cutâneas nos animais portadores de sarcoide equino.....	23
Tabela 7 - Número de amostras dos tipos clínicos de sarcoide equino.....	23
Tabela 8 - Alterações morfológicas na epiderme do sarcoide equino, entre os diferentes tipos, segundo critérios de Martens et al. (2000).....	26
Tabela 9 - Alterações morfológicas na parte dérmica entre os diferentes tipos de sarcoide equino, de acordo com os critérios utilizados por Martens et al. (2000).....	26
Tabela 10 - Número (n) e percentual (%) da raça, sexo, idade, pelagem e multiplicidade de lesões das amostras de acordo com o tipo clínico de sarcoide equino.....	36
Tabela 11 - Número (n) e percentual (%) do tamanho das amostras de acordo com o tipo clínico de sarcoide equino.....	37
Tabela 12 - Localização das amostras de sarcoide equino, segundo o tipo clínico.....	37

Tabela 13 - Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do número de AgNORs e da relação da área dos NORs com a área do núcleo das células, entre os tipos clínicos de sarcoide equino.....	40
Tabela 14 - Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do índice de proliferação celular utilizando o anticorpo anti-Ki-67 (MIB 1), segundo o tipo clínico de sarcoide equino.....	45
Tabela 15 - Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do índice apoptótico utilizando o anticorpo anti-caspase-3, segundo o tipo clínico de sarcoide equino.....	47
Tabela 16 - Número de casos e porcentagem da localização da expressão da p53 no sarcoide equino.....	50
Tabela 17 - Número de casos e porcentagem da localização da expressão da p53 entre os diferentes tipos de sarcoide equino.....	51

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Equino, Puro Sangue Inglês, Macho, 5 anos. Pele. Sarcoide equino fibroblástico na face lateral do terço médio da região metatársica (seta a), e sarcoide equino verrucoso em face dorsal da porção distal da região metatársica (seta b)..... 24
- Figura 2 - Sarcoide equino verrucoso caracterizado por massa de tecido esbranquiçada de contornos irregulares..... 24
- Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a formação de *rete peg* (setas). Hematoxilina e Eosina..... 27
- Figura 4 - Fotomicrografia mostrando o posicionamento perpendicular dos fibroblastos em relação à epiderme, *picket fence* (seta), Hematoxilina e Eosina..... 27
- Figura 5 - Fotomicrografia mostrando o tipo clínico verrucoso com arranjo em verticilos dos fibroblastos (setas), Hematoxilina e Eosina..... 28
- Figura 6 - Fotomicrografia mostrando a proliferação dos fibroblastos dérmicos com alta celularidade e arranjo fasciculado (setas), Hematoxilina e Eosina..... 28
- Figura 7 - Fotomicrografia mostrando a atrofia da epiderme e a ausência de folículos pilosos e de glândulas sudoríparas no tipo clínico nodular (setas), Hematoxilina e Eosina..... 29
- Figura 8 - Fotomicrografia mostrando o “amoldamento” dos folículos pilosos em relação à derme no sarcoide equino nodular (setas). Hematoxilina e Eosina..... 29
- Figura 9 - Fotomicrografia mostrando os fibroblastos com citoplasma mais “alongado” no tipo clínico verrucoso (seta), Hematoxilina e Eosina..... 30

Figura 10 - Fotomicrografia mostrando sarcoide equino associado a processo inflamatório relacionado à habronemose (setas), Hematoxilina e Eosina.....	30
Figura 11 - Fotomicrografia mostrando a formação de pseudo-cápsula (seta) em sarcoide equino do tipo clínico nodular, Hematoxilina e Eosina.....	31
Figura 12 - Fotomicrografia mostrando a proliferação homogênea de vasos sanguíneos nas projeções exofíticas do tipo clínico fibroblástico, Hematoxilina e Eosina.....	31
Figura 13 - Fotomicrografia detalhando a proliferação homogênea de vasos sanguíneos na projeção exofítica do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.....	32
Figura 14 - Fotomicrografia mostrando o arranjo mixoide que os fibroblastos do sarcoide equino adquirem nas proximidades de focos inflamatórios (setas), Hematoxilina e Eosina.....	32
Figura 15 - Fotomicrografia mostrando as áreas alternadas de epitélio acantótico (seta a) e atrófico (seta b) nas projeções exofíticas do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.....	33
Figura 16 - Fotomicrografia mostrando as áreas de hiperplasia regular no epitélio acantótico e atrófico (setas) das projeções exofíticas do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.....	33
Figura 17 - Fotomicrografia mostrando sarcoide equino verrucoso frequentemente associado a <i>plugs</i> córneos (seta), Hematoxilina e Eosina.....	34
Figura 18 - Fotomicrografia mostrando a capacidade invasiva dos fibroblastos neoplásicos do sarcoide equino infiltrando à musculatura adjacente, Hematoxilina e Eosina.....	34
Figura 19 - Tamanho das tumorações cutâneas nos animais portadores de sarcoide equino, segundo o tipo clínico, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.....	38

Figura 20 - Fotomicrografia mostrando os fibroblastos dérmicos com pontos de NORs múltiplos no interior do núcleo (setas). AgNOR, contra-coloração: verde luz.....	41
Figura 21 - Número de Nors nas células e a área média do núcleo celular ( $\text{um}^2$ ) na derme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.....	42
Figura 22 - Número de Nors nas células e a área média o núcleo celular ( $\text{um}^2$ ) na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.....	43
Figura 23 - A média da relação de Nors nas células pela área média dos núcleos celulares ( $\text{um}^2$ ) na derme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.....	44
Figura 24 - Fotomicrografia mostrando a imuno-marcação para Ki-67. Positividade em fibroblastos em proliferação. Imuno-histoquímica, Ki-67, 1:100, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.....	46
Figura 25 - Fotomicrografia mostrando a imuno-marcação para caspase-3. Positividade em fibroblastos de forma difusa (seta a) e puntiforme (seta b). Imuno-histoquímica, Caspase-3, 1:600, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.....	48
Figura 26 - A imuno-marcação da porção proliferativa pelo Ki-67 na derme e na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino. A imuno-marcação da apoptose pela caspase-3 na derme e na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.....	49
Figura 27 - Fotomicrografia mostrando a expressão da p53 perinuclear pelas células neoplásicas do sarcoide equino. Imuno-histoquímica, p53, 1:1600, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.....	52

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 Procedência dos animais e material de arquivo.....</b>	<b>12</b>
3.1.1. Estudo retrospectivo e prospectivo.....	12
<b>3.2 Tipos clínicos de sarcoide equino.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Processamento histopatológico do material.....</b>	<b>13</b>
3.3.1. Avaliação histopatológica.....	14
3.3.1.1. Descrição morfológica.....	14
<b>3.4. Técnica histoquímica.....</b>	<b>14</b>
3.4.1. AgNOR ( <i>Argyrophil Nucleolar Organizer Regions</i> ).....	14
3.4.1.1. Avaliação quantitativa de AgNORs.....	15
<b>3.5. Técnicas Imuno-histoquímicas.....</b>	<b>16</b>
3.5.1. Avaliação imuno-histoquímica dos índices de proliferação celular pelo Ki-67 e do índice apoptótico pela Caspase-3.....	18
3.5.1.2. Avaliação imuno-histoquímica pela expressão da p53.....	19
3.5.1.3. Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica.....	19
<b>3.6. Análise estatística.....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Dados clínicos dos animais.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Morfologia microscópica.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Tipo clínico.....</b>	<b>35</b>
4.3.1. Índice de proliferação celular pelo método de AgNORs.....	39
4.3.2. Índice de proliferação celular pelo método de Ki-67 (MIB-1)..	45
4.3.3. Índice de apoptose pelo método da caspase-3.....	47
4.3.4. Expressão da p53.....	50
4.3.4.1. Índice de fator recorrência pela expressão da p53 no sarcoide equino.....	51

4.4. Correlação de todas as variáveis estudadas neste projeto.....	53
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. TRABALHO CIENTÍFICO.....	66

CREMASCO, A.C.M. **Correlações clínico-patológicas das avaliações da proliferação celular pelos métodos de AgNORs e expressão de Ki-67, do índice apoptótico pela expressão de caspase-3 e da expressão da p53 no sarcoide equino.** Botucatu, 2011. 74 p. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

## **RESUMO**

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o índice proliferativo das amostras de sarcoide equino pelo método histoquímico de AgNOR e por método imuno-histoquímico pela expressão do Ki-67 (MIB 1); a avaliar o índice apoptótico pela expressão de caspase-3; e a expressão da p53 mutante e “wild type” no sarcoide equino por meio de método imuno-histoquímico. Além disso, procurou correlacionar esses dados com os tipos clínicos de sarcoide equino, sendo cada amostra classificada clinicamente, segundo Knottenbelt (2005), a partir das descrições recuperadas nos prontuários de registro dos animais e das fichas de diagnóstico dos casos utilizados neste projeto. As amostras utilizadas foram recuperadas do material de arquivo, sendo utilizadas também novas amostras encaminhadas durante o período de realização deste projeto. Desta forma, 41 amostras de sarcoide equino provenientes de 35 equinos. O presente estudo demonstrou que entre os animais portadores de sarcoide equino, excluindo-se os SRD, predominaram àqueles pertencentes às raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês e Mangalarga, preponderando os machos em relação às fêmeas, sendo que 83% dos animais possuíam menos de dez anos de idade. A localização preferencial das neoplasias na nossa casuística foi na região da cabeça, seguida dos membros e da região peitoral, prevalecendo as lesões únicas e maiores do que quatro centímetros. Dos tipos clínicos de sarcoide equino, o mais frequente entre os animais incluídos neste estudo foi o fibroblástico, seguido dos tipos verrucoso, nodular e misto, sendo o tipo oculto pouco frequente. Os resultados não mostraram diferença significativa quanto a proliferação celular (AgNOR e Ki-67), e quanto ao tipo de marcação da p53 entre os tipos clínicos de sarcoide equino. A expressão da p53 mostrou-se predominantemente perinuclear, independentemente do tipo clínico de sarcoide. Esta localização pode indicar a inativação funcional desta proteína. A imuno-marcação pela caspase-3 mostrou que o índice apoptótico foi mais elevado nos tipos clínicos fibroblástico e nodular, e menor no tipo clínico verrucoso. Este dado pode ser utilizado como mais uma ferramenta para a diferenciação microscópica dos tipos clínicos de sarcoide.

Palavras-chave: Oncologia, Patologia, Pele, Sarcoide equino.

CREMASCO, A.C.M. **Clinical and pathological correlations of cell proliferation evaluations by AgNORs and Ki-67 expression methods, apoptotic index by caspase-3 and p53 expression in equine sarcoid.** Botucatu, 2011. 74 p. Master's Dissertation – Universidade Estadual Paulista. School of Veterinary Medicine and Animal Science.

## **ABSTRACT**

This study has been elaborated to evaluate the proliferative index of equine sarcoid samples by AgNOR methodology and Ki67 immunohistochemical expression; to also evaluate the apoptotic index by caspase-3 immunohistochemical expression, as well as the expression of p53 mutant and "wild type" protein. Moreover, we correlate these data with clinical types of equine sarcoid, according to Knottenbelt (2005), from descriptions recovered of animals data reports and diagnosis files of case studied in this project. Tissue samples were obtained from 35 horses who had their masses submitted to the Pathology Service at São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil, and new clinical cases during the study. Breeds most affected were Quarter Horse, Thoroughbred and Mangalarga. Males were more affected and 83% of the animals *were* less than ten years old. The preferential location of the tumors in our series was in the head, followed by members and chest area, prevailing single lesions *larger* than four centimeters. As for the clinical types of equine sarcoid, the most frequent included fibroblast, followed by verrucous, nodular and mixed. The results showed no significant differences in cell proliferation and the type of p53 expression between the clinical types of equine sarcoid. The expression of p53 has demonstrated to be predominantly perinuclear, regardless the clinical type of sarcoid. This location may indicate the functional inactivation of this protein. The expression of caspase-3 showed that the apoptotic index was higher in fibroblastic and nodular clinical types, and lower in verrucous clinical type. This data can be used as an additional tool for microscopic differentiation of clinical types of sarcoid.

Key words: Oncology, Pathology, Skin, Equine Sarcoid.

## 1. INTRODUÇÃO

O sarcoide equino é uma neoplasia cutânea, de origem fibroblástica, localmente invasiva dos equinos que não metastatiza (RAGLAND, 1970), que apresenta forma única ou múltipla com tendência a recorrência (RAGLAND, 1970; MARTI et al., 2003), não sendo influenciado pela raça (MARTI et al., 2003; BROSTOM, 1995), nem pelo sexo e que acomete principalmente animais jovens (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; SCOTT & MILLER Jr., 2003). Geralmente ocorre em regiões do corpo previamente traumatizadas seja de forma acidental ou por intervenção cirúrgica (TORRONTGUI & REID, 1994), assim as localizações predominantes incluem a cabeça, a região cervical, axilas, abdômen, região paragenital e membros (SCOTT & MILLER Jr., 2003). Muitos estudos associaram o sarcoide equino com a infecção pelo papilomavírus bovino, mais especificamente o PVB-1 e PVB-2 (TEIFKE et al., 1994; MARTENS et al., 2000; CHAMBERS et al., 2003; WOBESER et al., 2010; YUAN et al., 2010).

Atualmente são reconhecidos seis tipos clínicos da neoplasia, o oculto, o verrucoso, o nodular, o fibroblástico, o maligno e o misto (KNOTTENBELT, 2005). Tem sido descrita a preferência de uma determinada forma de apresentação clínica por regiões específicas do corpo do animal (KNOTTENBELT, 1995; SCOTT & MILLER Jr., 2003).

Os mecanismos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento do sarcoide equino não são conhecidos, porém sabe-se que o câncer tem sua origem na perturbação do controle do ciclo celular (NIXON et al., 2005). A utilização de marcadores de proliferação como Ki-67 e de métodos histoquímicos como AgNOR, assim como da expressão das caspases para a determinação do índice apoptótico e a expressão de proteínas que controlam o ciclo celular como a p53 tem se mostrado úteis em estudos sobre o comportamento biológico de diversas neoplasias (CROCKER et al., 1987; ALVES et al., 1999; GRIFEY et al., 1999; ROBERT & FRIEDLANDER, 2003; SCHMIDT et al., 2006). Embora, o componente mesenquimal dos sarcoides não apresente altos níveis proliferativos, são poucos ainda os estudos que enfocaram este aspecto (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005; KASPEROWICZ et al. (2006; BOGAERT et al., 2007). Além disso, a localização anormal da p53 no componente fibroblástico dos sarcoides, que levaria a inativação desta proteína já foi verificada (BUCHER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1996; MARTENS et al., 2000). Por outro

lado, não existem dados sobre a determinação do índice apoptótico pela expressão das caspases no sarcoide equino.

Assim sendo a avaliação de marcadores do comportamento biológico das neoplasias nos diferentes tipos clínicos de sarcoides, podem fornecer dados importantes que auxiliem no diagnóstico, no prognóstico e no tratamento destes tumores.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho são:

- ✓ Avaliar a taxa de proliferação dos sarcoides equinos utilizando o método histoquímico de AgNORs e por método imuno-histoquímico pela expressão do Ki-67 (MIB-1).
- ✓ Avaliar o índice apoptótico dos sarcoides equinos utilizando o método imuno-histoquímico pela expressão da Caspase-3.
- ✓ Avaliar a expressão da p53 mutante e “wild type” nos sarcoides equinos por meio de método imuno-histoquímico.
- ✓ Correlacionar os tipos clínicos de sarcoide equino com os índices proliferativos e apoptóticos, e com a expressão da p53.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Sarcoide equino é a neoplasia cutânea mais frequente entre os equídeos, independentemente da raça, sexo ou mesmo característica de pelagem. O aparecimento deste tipo de lesão não sofre influência sazonal, tendo sido relatada a sua ocorrência em várias regiões do mundo (RAGLAND et al., 1970; MARTI et al., 1993; GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; SCOTT & MILLER Jr., 2003; GINN et al., 2007). Seu comportamento clínico é localmente agressivo devido à capacidade infiltrativa, além de ser refratário a diferentes formas de terapias (PLUMMER, 2005).

Este processo foi primeiramente caracterizado por Jackson em 1936, na África do Sul, que definiu a lesão como uma “neoplasia benigna única da pele, localmente invasiva, com componente epidérmico variável e propensão à recorrência.” O nome sarcoide foi sugerido devido à aparência sarcomatosa maligna das lesões (KNOTTENBELT, 2005) e para distingui-lo de outros tumores cutâneos fibroblásticos como o fibroma, o fibrossarcoma, e os papilomas (JACKSON, 1936). Apesar da similaridade na terminologia, não apresenta correlação com a sarcoidose em seres humanos (MC GAVIN & ZACHARY, 2007), embora haja relatos desta enfermidade nos equinos (REIJERKERK et al., 2009). As lesões neoplásicas ocorrem em qualquer região do corpo, porém são registradas com maior frequência na cabeça, especialmente no pavilhão auricular, comissura labial e região periocular, além da região cervical, membros e região ventral (abdominal e paragenital) do corpo. Segundo Scott & Miller Jr. (2003), de 14% a 84% das lesões são múltiplas, podem surgir repentinamente, como também desaparecer espontaneamente ou perdurar.

A redução do valor econômico dos animais afetados deve-se ao comprometimento da utilização destes, além do aspecto estético, especialmente quando os tumores se localizam nos membros posteriores, canto da boca e pálpebras (LAZARY et al., 1985; MEREDITH et al., 1986). A localização periocular do sarcoide equino do tipo clínico fibroblástico representa uma dos maiores desafios encontrados pelos cirurgiões, pela dificuldade de preservação do olho (LAVACH et al., 1985; KNOTTENBELT, 2005; PLUMMER, 2005).

Morfologicamente, o sarcoide equino é uma neoplasia de tecido fibroso, com origem fibroblástica, não metastatizante, que mostra muito frequentemente o envolvimento da epiderme (KNOTTENBELT, 2005; GIN et al., 2007). As células neoplásicas são fusiformes ou estreladas e, geralmente, mostram hipercromasia e atipia,

com arranjo variando entre fasciculado e a disposição em verticilos. O número de mitoses geralmente é baixo, embora variável. Os limites da neoplasia são geralmente indistintos (SCOTT & MILLER Jr., 2003).

Parece não haver predileção por raças (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995). No entanto, alguns autores citam maior suscetibilidade para animais das raças Appaloosa, Puro Sangue Árabe (ANGELOS, 1998), Quarto-de-Milha (WOBESER et al., 2010; ANGELOS, 1998), e Puro Sangue Inglês (ANGELOS, 1998; PLUMMER, 2005). No Brasil, estudos realizados no Rio Grande do Sul, relatam que a raça Crioula é a mais comumente acometida (RAMOS et al., 2008; BRUM et al., 2010). Em contrapartida, no noroeste dos EUA, o sarcoide equino é mais frequente nas raças Paint Horse, Quarto-de-Milha e Puro Sangue Árabe, sendo o único tumor cutâneo encontrado em asininos e muares (VALENTINE, 2006). Deve-se ressaltar que estes dados provavelmente têm relação direta com a composição racial da população equina nas regiões estudadas e com o tipo de utilização dos animais.

Da mesma forma, não parece haver diferença na suscetibilidade entre os sexos, mas animais castrados mostram acometimento mais frequente (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995; ANGELOS, 1998; PLUMMER, 2005).

A faixa etária dos animais acometidos pelo sarcoide equino encontra-se entre três e sete anos de idade (SCOTT & MILLER Jr., 2003, RAMOS et al. 2008), embora animais com apenas um ano possam apresentar a neoplasia (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995). Em áreas com alta prevalência de sarcoide equino, a ocorrência do tumor em cavalos senis não é incomum (SCOTT & MILLER Jr., 2003).

Existem seis tipos de apresentação clínica, reconhecidos (KNOTTENBELT, 2005), que se correlacionam com a característica histológica da lesão (MARTENS, 2000; SCOTT & MILLER Jr., 2003). O tipo oculto ou superficial é caracterizado por áreas circulares alopecicas e rugosas na pele. O tipo verrucoso, como o próprio nome indica, tem aparência semelhante a uma verruga. O tipo nodular apresenta dois subtipos. As lesões únicas ou os agregados lobulados de massas subcutâneas esféricas correspondem ao subtipo A. Já o subtipo B é representado por nódulos múltiplos com envolvimento cutâneo e não aderidos ao tecido subjacente. O sarcoide tipo fibroblástico possui aparência exofítica fibrovascular, frequentemente lembrando tecido de granulação, sendo que o subtipo um apresenta-se pedunculado enquanto que o subtipo dois apresenta uma base localmente invasiva. O sarcoide do tipo maligno é uma forma agressiva e localmente invasiva com infiltração linfática, resultando em múltiplos

cordões de massas tumorais estendendo-se à pele e ao tecido subcutâneo adjacente. Também são reconhecidos tipos mistos, forma relativamente comum e representam lesões que possuem características pertencentes a dois ou mais tipos descritos anteriormente (KNOTTENBELT, 2005).

A frequência dos tipos clínicos do sarcoide equino parece mostrar alguma variação geográfica. O tipo oculto e o tipo verrucoso são particularmente comuns no Reino Unido, porém não são frequentes na África e na Austrália (KNOTTENBELT & MATHEWS, 2001). Na literatura nacional, são poucos os dados sobre a frequência dos tipos clínicos de sarcoide equino.

Vários estudos demonstram a localização preferencial de determinadas formas de apresentação clínica em regiões específicas do corpo. Assim o sarcoide do tipo oculto ocorre mais frequentemente na região cervical, na face, face medial da coxa e região escapular. Já o sarcoide do tipo verrucoso, embora também acometa as regiões da cabeça e cervical, é o tipo predominante na axila e na virilha. As localizações palpebral, prepucial ou mesmo na região da virilha podem mostrar a apresentação típica do sarcoide do tipo nodular. O sarcoide do tipo fibroblástico além de comprometer a axila, a virilha, os membros e a região periocular, é observado naqueles locais previamente traumatizados ou mesmo quando os traumas ocorrem em locais onde já havia a presença de um sarcoide equino com apresentação clínica diferente. Nas regiões da mandíbula e do codilho predomina a forma mais agressiva da neoplasia denominada de sarcoide do tipo maligno (KNOTTENBELT, 1995; SCOTT & MILLER Jr., 2003).

Algumas tentativas têm sido feitas no sentido de se estabelecer correlações entre as formas clínicas ou tipos de sarcoide equino e as características histológicas das lesões (MARTI et al., 1993; SCOTT & MILLER Jr., 2003). Martens et al. (2000), considerando cinco tipos clínicos - oculto, verrucoso, nodular, fibroblástico e misto – relataram que os tipos verrucoso e misto caracterizavam-se por hiperplasia epidérmica e hiperqueratose, além de nítida atividade dermoepidérmica, com formação de “*rete pegs*” e orientação perpendicular dos fibroblastos em relação à membrana basal ou junção dermoepidérmica (“*picket fence*”). Relatam também que estas características, frequentemente, estavam ausentes nos sarcoides dos tipos oculto e nodular. Os mesmos autores verificaram que os sarcoides do tipo fibroblástico apresentavam ulceração associada a infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Segundo Scott & Miller Jr. (2003), os achados histológicos podem não ser definidores de um tipo clínico específico, porém podem ser utilizados para a sua exclusão. Estes mesmos autores ressaltam que a

quantidade de fibras colágenas varia. A proliferação dos fibroblastos dérmicos encontra-se sempre presente (TARWID et al., 1985; SCOTT & MILLER Jr., 2003).

A transmissão entre animais é proposta por contato direto ou indireto. Além disso, acredita-se que as lesões iniciais disseminem-se para outras áreas no mesmo equino, havendo inclusive a possibilidade de que haja a transmissão para outros equinos através de mordidas, fricção, fômites e insetos (MOHAMMED et al., 1992; TORRONTAGUI & REID, 1994; SCOTT & MILLER Jr., 2003; FINLAY et al., 2009).

O sarcoide equino não metastatiza, porém apresenta alto índice de recorrência e raramente regride espontaneamente (RAGLAND et al., 1970; KNOTTENBELT, 2005). A recidiva ocorre em 20-50% dos casos, após intervenção cirúrgica (TARWID et al., 1985; MARTENS et al., 2001). Assim a apresentação clínica inicial pode se transformar em outra, ou mesmo tumores únicos dar origem a lesões múltiplas. Estas transformações podem ocorrer como consequência de traumas, que muitas vezes têm sua origem nos próprios procedimentos utilizados para o diagnóstico, como as biopsias incisionais ou excisionais (SCOTT & MILLER Jr., 2003; KNOTTENBELT, 2005; PLUMMER, 2005). Esta característica clínica é observada principalmente nos tipos nodular e verrucoso, que, no entanto, sem razão aparente, podem transformar-se dramaticamente em tumores de crescimento rápido e de difícil tratamento, como os sarcoides do tipo maligno e fibroblástico (BOGAERT et al., 2007). Invasão e infiltração locais são comuns em tumores fibroblásticos e os tumores malignos podem mostrar extensa infiltração dos vasos linfáticos (KNOTTENBELT, 2005). Yuan et al. (2010) confirmaram que o aumento da expressão da atividade das Metaloproteinases em células do sarcoide equino possibilitam a invasão das células tumorais nos tecidos circundantes permitindo a propagação localizada do DNA viral.

O PVB-1 induz a um estímulo das células inflamatórias, dos inibidores da apoptose e dos promotores da motilidade celular e a redução da efetividade de ambas as respostas imunes adaptativa e inata (YUAN et al., 2008). A oncoproteína E5 do PVB-1 tem o comportamento semelhante em equinos e bovinos, em relação à transformação das células sem imortalização concomitante, e na redução do MHC-1.

Já é conhecida a expressão da proteína transformante principal (E5) dos PVBs tipos 1 e 2 nos sarcoides equinos, porém parece não ocorrer a infecção produtiva geradora de virions (YUAN et al., 2007). A expressão desta proteína produzida por genes virais pode contribuir para a persistência do vírus, assim como para a patogênese da doença por reduzir a expressão de MHC classe I (NASIR et al., 1997, MARCHETTI

et al., 2009). Este poderia ser o mecanismo de evasão utilizado pelo PVB nos casos de sarcoide equino e que tem sido descrito como responsável pela progressão maligna associada a neoplasias relacionadas aos papilomavírus (CHAMBERS et al., 2003).

A invasão e a migração de células tumorais para sítios distantes do tumor principal pode ser uma das causas da alta recorrência (RAGLAND et al., 1970) e, a consequente dificuldade de tratamento do sarcoide equino (KNOTTENBELT, 2005). O sarcoide equino recorrente exige tratamento complementar, como quimioterapia e a imunoterapia, após excisão cirúrgica inadequada (MARTENS et al., 2001).

Muitos estudos demonstraram a associação com a infecção pelo papilomavirus bovino (PVB) (ANGELOS et al., 1991; CHAMBERS et al., 2003; REID et al., 1994, NASIR et al., 1997, YUAN et al., 2007). Esta associação baseia-se na identificação do DNA de PVB-1 e PVB-2 nos sarcoides equinos (TEIFKE et al., 1994; MARTENS et al., 2000; CHAMBERS et al., 2003; WOBESER et al., 2010; YUAN et al., 2010). Além disso, o DNA viral também tem sido encontrado em pele normal de equinos, o que sugere a existência de uma fase de latência do processo, assim como explicaria a alta taxa de recorrência após a excisão cirúrgica (SCOTT & MILLER Jr., 2003).

Embora haja aspectos hereditários que devam ser ressaltados, é importante caracterizar que a etiologia é provavelmente multifatorial. Assim, esta neoplasia deve ser considerada como um tumor induzido por vírus com uma variedade ampla de manifestações que são resultado de interações entre o agente etiológico, o ambiente e genoma do hospedeiro (BROSTOM, 1995).

Os mecanismos celulares e moleculares exatos que levam ao desenvolvimento do sarcoide equino não são conhecidos. No entanto, a perturbação nos mecanismos de controle do ciclo celular é uma característica biológica comum no câncer humano e, entretanto, sua ocorrência na patogênese do sarcoide equino permanece pouco investigada (NIXON et al., 2005).

O crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: o tempo do ciclo celular, a porcentagem das células em proliferação e o número de células perdidas. Portanto, além dos marcadores de proliferação celular, outro índice muito importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILIPS et al., 2000).

A proliferação celular tem sido amplamente estudada por mostrar uma boa correlação com o comportamento biológico dos tumores, permitindo que se obtenham informações que orientem o tratamento e o prognóstico entre pacientes oncológicos

(NIXON et al., 2005; ROELS et al., 1999). A atividade proliferativa de um tumor é um índice potencialmente útil para a previsão de seu avanço e evolução.

Existem muitos métodos de avaliação da proliferação celular, entre estes podem ser citadas técnicas simples como a contagem das figuras de mitose ou métodos mais sofisticados como a contagem dos AgNORs (*Argyrophil Nucleolar Organizer Regions*) por métodos histoquímicos e a avaliação imuno-histoquímica, utilizando-se a marcação dos antígenos Ki-67 (MIB-1) e PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (GRIFEY et al., 1999).

O antígeno Ki-67 (MIB-1) pode ser detectado em todas as fases do ciclo celular menos na G0 (GERDES et al., 1991), tendo portanto, relação direta com a fração de crescimento de uma população celular (GERDES et al., 1991; ALVES et al., 1999). É considerado como o melhor marcador imuno-histoquímico de proliferação celular pela maior consistência biológica da fração de crescimento, relacionado à expansão e metástase (ALVES et al., 1999).

A marcação imuno-histoquímica pelo Ki-67 para avaliar o índice proliferativo dos sarcoides equinos foi utilizada por poucos autores (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005; BOGAERT et al., 2007). Geralmente, a porção mesenquimal das lesões relacionadas ao sarcoide equino não está associada a altos níveis proliferativos, mostrando índices semelhantes aos encontrados na pele normal (NIXON et al., 2005). Porém, quando avaliadas em separado, as regiões mais superficiais dos tipos verrucoso e fibroblástico mostram atividade proliferativa significativamente mais alta, se comparadas aos tipos oculto e nodular (MARTENS et al., 2000; BOGAERT et al., 2007). Estes achados sustentam as observações prévias, inclusive clínicas, de que o sarcoide equino pode permanecer quiescente durante anos (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005).

O índice de proliferação pode ser determinado também por meio de métodos histoquímicos, utilizando-se a contagem das AgNORs. As NORs são estruturas presentes nos núcleos celulares, relacionadas com a síntese de proteínas nas células em proliferação. O grande número de NORs reflete um alto índice de proliferação e a intensidade da marcação indica a velocidade do ciclo. As NORs podem ser detectadas por métodos que utilizam a impregnação pela prata (CROCKER et al., 1987).

A marcação pela prata das NORs pode ser demonstrada em cortes de tecido devido a afinidade das histonas pela prata coloidal, estes produtos representam a reação corada AgNOR. Segundo Derenzini & Ploton (1991), quanto maior o número de NORs,

menor é a duração do ciclo celular e maior é a velocidade de proliferação celular. Essa relação faz da análise quantitativa das NORs um excelente indicador da atividade de proliferação das células e uma valiosa ferramenta de diagnóstico, pois permite a diferenciação entre tumores benignos e malignos, podendo ser utilizado no prognóstico dos diferentes tipos de câncer.

Este método histoquímico é muito utilizado na Medicina Veterinária, pois além do baixo custo, da boa relação com o grau da neoplasia e com o prognóstico, permite determinar a velocidade do processo proliferativo (DERENZINI & PLOTON, 1991; KIUPEL et al., 1999). Existe apenas uma citação sobre a utilização deste método histoquímico na avaliação da proliferação no sarcoide equino por Kasperowicz et al. (2006). Atualmente, a utilização na espécie equina ainda é bastante restrita, ficando limitada a estudos genéticos (SLOTA et al., 2007).

Acredita-se que com a associação do método histoquímico de AgNOR e a detecção imuno-histoquímica da expressão de Ki-67 pode-se obter uma visão mais precisa do processo proliferativo e potencial maligno do sarcoide equino.

Além dos marcadores de proliferação celular, outro índice muito importante relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILIPS et al., 2000). O fenômeno apoptótico tem relação com a progressão tumoral.

Um dos métodos de quantificar a frequência de células tumorais que estão em apoptose é avaliar a expressão de algumas enzimas relacionadas diretamente com este evento, as chamadas caspases. As caspases estão presentes no citoplasma da maioria das células, nas suas formas inativas como uma cadeia única de polipeptídeos, sendo ativadas quando esta cadeia é quebrada (ROBERT & FRIEDLANDER, 2003).

Mais de dez tipos de caspases já foram descritos nos mamíferos, sendo a caspase-3, a mais estudada. Estudos sugerem que tanto o nível da expressão da caspase-3, como a sua forma de marcação intracitoplasmática, tem relação com a progressão tumoral (DONOGHUE et al., 1999; DUKERS et al., 2002).

Ainda são poucos os dados na literatura veterinária sobre a utilização da marcação pela caspase-3 para a determinação do índice apoptótico, principalmente na espécie equina. Além disso, não existem dados na literatura consultada sobre a determinação imuno-histoquímica da expressão de caspase-3 no sarcoide equino. Já que estas lesões parecem não estar associadas a altos índices proliferativos, é natural que se suspeite que o acúmulo de células tumorais seja consequência também de alterações nos mecanismos de apoptose.

A apoptose é um mecanismo de morte celular de várias etapas e finamente ajustado, podendo ser acionado pelas vias extrínseca (dependente de receptor de morte) ou intrínseca (via mitocondrial) (CHEN & WONG, 2008). A apoptose, assim como a senescência e o sequestro da célula do ciclo celular, é dependente da ativação do gene p53, sendo a escolha do destino da célula o resultado do tipo de sinal recebido e do contexto no qual a célula se encontra (HAUPT et al., 2003). O gene p53 estimula uma ampla rede de sinais que induzem a apoptose tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca (HOFSETH et al., 2004). É um gene supressor tumoral que age como regulador da multiplicação celular, além de desempenhar papel fundamental no reparo do dano ao DNA. A sua perda de função leva a vantagem seletiva das células transformadas. A proteína codificada pelo gene p53 é lábil e raramente pode ser detectada por métodos imuno-histoquímicos em cortes histológicos. Porém, nas células neoplásicas, a mutação do gene leva ao acúmulo de proteína não-funcional detectável por métodos imuno-histoquímicos (SCHMIDT et al., 2006). A função do tipo selvagem da p53 pode ser inativada por uma série de mecanismos, incluindo a formação de complexos com produtos de oncogenes virais, proteínas celulares e mutação. Mutações somáticas no gene p53 são as alterações genéticas mais comuns nos tumores humanos, frequentemente compreendendo os exons 5-8 (LEVINE et al., 1994; SOUSSI et al., 1994). A perda de propriedades supressoras tumorais normais da proteína p53 tem sido relatada em alguns tumores dos animais domésticos (NIXON et al., 2005). Parece provável que alguns tumores de pele de equinos sejam influenciados pela exposição a raios ultravioletas que causa a mutação do gene p53 (MUNDAY & KIUPEL, 2010).

Alguns investigadores têm avaliado a participação do gene p53 no sarcoide equino. Bucher et al. (1996) não conseguiu detectar mutações no gene p53 nestas lesões tumorais, sugerindo que este gene não teria papel importante na patogênese do sarcoide equino. Este achado foi corroborado por investigações posteriores em asininos (NASIR et al., 1999). Entretanto, foi demonstrado que 44% das lesões de sarcoide em equinos mostravam localização aberrante perinuclear da proteína p53, sugerindo que a sua inativação não teria origem mutacional, mas a perda da função ocorreria provavelmente devido a localização anormal da proteína (BUCHER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1996; MARTENS et al., 2000), resultando na perturbação do ciclo celular e no equilíbrio entre a proliferação e morte celular, devido a anormalidades nas vias de apoptose (NIXON et al., 2005). O papilomavírus codifica três oncoproteínas (E5, E6 e

E7) que interferem com a função de proteínas celulares envolvidas no controle do ciclo celular, tais como a p53 (CAMPO, 2003).

Pelo que foi aqui exposto, nota-se que muitos avanços foram obtidos na compreensão desta neoplasia, porém muito ainda precisa ser elucidado. A avaliação dos índices proliferativos e a comparação destes com os índices apoptóticos podem fornecer dados mais fidedignos sobre o comportamento da população de células neoplásicas nos diferentes tipos de apresentação clínica do sarcoide equino. Embora a análise do compartimento proliferativo deste tipo de neoplasia, pela expressão da proteína Ki-67, não tenha demonstrado resultados animadores, acreditamos que a utilização da técnica de AgNOR possa contribuir de forma mais consistente para este tipo de análise. No que diz respeito ao índice apoptótico, são poucos os dados encontrados sobre o estudo deste parâmetro nos sarcoides equinos. Parece-nos, que a pesquisa sobre a função da proteína p53 acompanhada da detecção da expressão da caspase-3 pelas células tumorais, poderá aprofundar mais os conhecimentos sobre o papel da apoptose nos sarcoides equinos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Procedência dos animais e material de arquivo

##### 3.1.1. Estudo retrospectivo e prospectivo

Nesta pesquisa, foi realizado o estudo retrospectivo de todos os casos de afecções cutâneas de equinos diagnosticados, no Serviço de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Campus de Botucatu – SP, no período de 1967 a 2010. Este material foi originado de biopsias ou intervenções cirúrgicas encaminhadas como peças cirúrgicas enviadas ao Serviço para diagnóstico por serviços do próprio Hospital da unidade ou por hospitais e clínicas particulares, e também provenientes de profissionais autônomos da região que utilizam o Serviço de Patologia para diagnóstico histopatológico. Desta forma, foram incluídos tanto os casos que constavam no arquivo do serviço, quanto os casos diagnosticados durante o período de desenvolvimento deste projeto.

O levantamento dos dados iniciou-se pelo arquivo de fichas de registro de diagnóstico e, posteriormente, os blocos e as lâminas correspondentes a cada caso, foram recuperados dos arquivos de Serviço de Patologia. Dos prontuários de registro referentes às fichas de diagnóstico foram obtidas informações sobre a raça, sexo, idade, pelagem, localização, o tamanho da neoplasia e a multiplicidade de lesões, descrição dos dados clínico-cirúrgicos de cada animal, assim como a descrição macroscópica das lesões colhidas, na data de sua apresentação clínica.

Embora tenham sido considerados os diagnósticos morfológicos que constavam das fichas originais, todos os 96 casos obtidos neste levantamento foram reavaliados do ponto de vista histopatológico, sendo estabelecidos os diagnósticos. Entre estes se incluíam processos neoplásicos e não-neoplásicos, processos bacterianos, fúngicos e parasitários. A partir do nosso levantamento foram utilizadas 36 amostras de sarcoide equino, que foram considerados adequados e apropriados para a realização deste projeto. Destes foram confeccionadas novas lâminas para descrição morfológica, para a análise imuno-histoquímica e histoquímica.

Dos novos casos encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, campus de Botucatu, cinco amostras foram utilizadas, sendo também registrados os dados referentes à raça, sexo, idade, pelagem, localização e descrição dos dados clínico-cirúrgicos, assim como a descrição macroscópica das lesões. Estes casos também foram utilizados para a análise imuno-histoquímica e

histoquímica, incluídas no projeto, totalizando 41 amostras, provenientes de 35 casos, durante o período de 24 meses (Março de 2009 a Fevereiro de 2011).

### 3.2. Tipos clínicos de sarcoide equino

Os dados clínicos recolhidos dos prontuários de registro foram utilizados para a observação do histórico clínico e para a classificação clínica por meio de sua forma de apresentação baseado na descrição de clínicos e cirurgiões. A classificação dos tipos clínicos foi realizada de acordo com Knottenbelt (2005).

As características de cada um dos tipos clínicos são apresentadas no **Quadro 1**.

QUADRO 1. Características dos tipos clínicos de sarcoide equino (KNOTTENBELT, 2005).

<b>Tipo Clínico</b>	<b>Característica</b>
Tipo Oculto ou Superficial	Áreas circulares alopecicas e rugosas na pele.
Tipo Verrucoso	Aparência semelhante a uma verruga.
Tipo Nodular apresenta 2 subtipos (A e B)	A - Lesões únicas ou agregados lobulados de massas subcutâneas esféricas. B - é representado por nódulos múltiplos com envolvimento cutâneo, não ocorrendo aderência aos tecidos subjacentes.
Tipo Fibroblástico	Aparência exofítica fibrovascular, frequentemente lembrando tecido de granulação, sendo que o <i>subtipo um</i> apresenta-se pedunculado enquanto que o <i>subtipo dois</i> mostra característica invasiva na sua base.
Tipo Maligno	Forma agressiva e localmente invasiva com infiltração linfática, resultando em múltiplos cordões de massas tumorais que se estendem à pele e ao tecido subcutâneo adjacente.
Tipos Mistos	Lesões que possuem características pertencentes a dois ou mais tipos.

### 3.3. Processamento histopatológico do material

O material de arquivo e o proveniente da rotina de diagnóstico do Serviço de Patologia, que foi recebido durante o período de desenvolvimento do projeto foram submetidos aos procedimentos de rotina para inclusão em parafina e cortados em micrótomo rotativo. Algumas amostras recuperadas do arquivo precisaram ser reemblocadas. Os cortes corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (LUNA et al., 1986) foram utilizados para a descrição dos achados histopatológicos, segundo os critérios estabelecidos por Martens et al. (2000). Cortes das mesmas amostras foram submetidos às técnicas de imuno-histoquímica e ao método de AgNORs.

### 3.3.1. Avaliação histopatológica

#### 3.3.1.1. Descrição morfológica

Para cada caso, utilizou-se os critérios histopatológicos utilizados por Martens et al. (2000), sendo considerados em relação a sua ausência ou presença. Eles são apresentados no **Quadro 2**.

QUADRO 2. Critérios morfológicos utilizados na análise histopatológica de sarcoide equino, de acordo com Martens et al. (2000).

Epiderme	Derme
Hiperkeratose	Densidade dos fibroblastos
Atrofia da epiderme	Arranjo dos fibroblastos
Hiperplasia	Cistos foliculares
<i>Rete pegs</i> (atividade dermo-epidérmica)	
<i>Picket fence</i> (posicionamento perpendicular dos fibroblastos em relação à junção dermo-epidérmica)	
Úlcera parcial	

### 3.4. Técnica histoquímica

#### 3.4.1. AgNOR (*Argyrophil Nucleolar Organizer Regions*)

A utilização desta técnica, descrita por Ploton et al. (1986), segue o protocolo contido no roteiro da apostila de técnicas de colorações específicas do Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ – UNESP.

Conforme a padronização da técnica, amostras de tecido cutâneo equino com diagnóstico de sarcoide equino e de carcinoma de células escamosas foram utilizadas, além de uma amostra de linfoma canino, todos incluídos em parafina. A amostra de carcinoma foi utilizada para que tivéssemos um controle da reação em tecido equino constituído por células com alto índice proliferativo e que possuem características que facilitam a visualização dos NORs, que se apresentam, geralmente, únicos, grandes e centrais. Por sua vez, a amostra de linfoma canino foi utilizada por ser um material que já foi padronizado para esta técnica no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia Veterinária. As amostras citadas foram processadas simultaneamente.

De cada uma das 41 amostras de sarcoide equino incluída em parafina foram obtidos cortes com quatro micrômetros de espessura. As lâminas com os cortes permaneceram em estufa a 56°C por 12 horas, sendo posicionadas em berço de

coloração e submetidas ao processo de desparafinização e hidratação. Para tanto, foram imersas em três soluções de xilol à temperatura ambiente por cinco minutos cada, seguidas de passagens sequenciais, em três soluções de álcool a 70%, 80% e 95%, por um minuto, e passagem em álcool absoluto. Então, foram imersas em água destilada e deionizada (quatro repetições).

Na técnica empregada, foram utilizadas as soluções A e B (solução de uso). A solução A, é constituída por uma mistura de 2% de gelatina incolor (1g) para laboratório dissolvida em 50 mL de água deionizada aquecida, sendo adicionado 1 mL de ácido fórmico. A solução B é constituída por nitrato de prata (30g) em 100 mL de água deionizada. A mistura é na proporção de uma parte da solução A para duas partes da solução B. A técnica consiste no preparo da solução no momento do uso.

Os cortes ficaram submersos na solução de uso em cuba de vidro vertical, com a finalidade de se evitar a formação de precipitado da prata inespecífico, ao abrigo da luz em câmara úmida, em estufa a 56°C durante 22 minutos. Após esta etapa, seguiram-se três lavagens em água deionizada aquecida. Em seguida, os cortes foram recobertos com tiosulfato de sódio a 5%, durante três minutos, lavados em quatro passagens de água destilada; receberam banhos em álcool 95%; e foram contra-corados com verde luz a 1% por um minuto e meio, para melhor visualização do colágeno. Posteriormente, foram submetidos à lavagem em água destilada; passagens em álcool 95% e álcool absoluto por dois minutos e banhos de xilol por cinco minutos, em cuba de vidro vertical.

#### 3.4.1.1. Avaliação quantitativa de AgNORs

As lâminas coradas pelo método de AgNORs foram utilizadas para a avaliação do número de NORs por núcleo celular por meio da contagem direta em 100 células da porção epitelial de cada amostra de sarcoide equino analisada, quanto 100 células da porção dérmica do tumor. Foi avaliada também a média da relação entre a área dos NORs ( $\mu\text{m}^2$ ) e a área do núcleo celular ( $\mu\text{m}^2$ ) de cada amostra de sarcoide equino, novamente, em 100 células da porção epitelial e em 100 células da porção dérmica do tumor, utilizando-se de microscopia óptica.

### 3.5. Técnicas imuno-histoquímicas

A padronização da técnica imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Pesquisa do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP.

Os anticorpos primários utilizados neste trabalho foram:

- p53 (NCL-p53-CM1) (Novocastra) - Anticorpo policlonal produzido em coelho contra a proteína de origem humana codificada pelo gene p53. Reconhece as formas, o tipo selvagem e mutante da proteína;
- Ki-67 (cód. 7240, clone MIB-1) (DakoCytomation Denmark S/A) - Anticorpo monoclonal produzido em camundongo contra a proteína nuclear Ki-67 de origem humana;
- Cleaved Caspase-3 (Asp 175) (cód. 9661) (Cell Signaling Technology, Inc.) - Anticorpo policlonal produzido em coelho destinado a detecção dos níveis endógenos dos fragmentos (17/19 kDa) da enzima caspase-3 ativa de origem humana;

O **Quadro 3** mostra as diluições em albumina sérica bovina a 1% de cada anticorpo utilizado.

QUADRO 3. Anticorpos primários e suas respectivas diluições para marcação imuno-histoquímica nas amostras de sarcoide equino.

ANTICORPO	DILUIÇÃO
p53	1:1600
Ki-67	1:100
Caspase-3	1:600

Durante a padronização da técnica, foi utilizada como controle positivo uma amostra de carcinoma de células escamosas na espécie equina, além de amostra de linfoma canino de alto grau para os anticorpos pesquisados neste projeto p53, Ki-67 e caspase-3 em cada bateria. A amostra de carcinoma foi utilizada para que tivéssemos um controle da reação em tecido equino.

Os cortes histológicos com três micrômetros de espessura realizados em micrótomo rotativo foram posicionados sobre lâminas eletrostáticas (ImmunoSlide, EasyPath<sup>®</sup>), que conferiram uma melhor fixação deste material nas lâminas e mantidos em estufa a 56°C por 16 horas.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas à desparafinização em três passagens, cada uma de cinco minutos, em xilol à temperatura ambiente, hidratação em soluções de álcool a 95%, a 80% e absoluto, por dois minutos e três lavagens em água destilada por cinco minutos.

Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se de solução de peróxido de hidrogênio (Merck<sup>®</sup>) a 30%, diluído em metanol na proporção 1:9, por dez minutos. Após este procedimento, para a remoção do peróxido do tecido, as lâminas foram submetidas a três lavagens de cinco minutos em água destilada.

A recuperação antigênica foi executada utilizando calor úmido sob pressão em câmara Pascal (DakoCytomation Denmark S/A) empregando-se solução de ácido cítrico a 10 mM, pH 6,0, a 127°C durante trinta segundos. As amostras fixadas em formalina requerem recuperação antigênica para os epítomos a serem pesquisados. A utilização deste fixador é prejudicial por originar ligações entre as cadeias proteicas ao redor dos sítios antigênicos, produzindo assim o mascaramento dos antígenos e interferindo na ligação com os anticorpos. Em seguida, o material foi submetido a resfriamento por vinte minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada de cinco minutos e três repetições.

Com a finalidade de evitar reações inespecíficas com proteínas teciduais, logo após a etapa do desmascaramento, os cortes foram imersos em solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé<sup>®</sup>) a 3% diluído em solução tampão TRIZMA base (D5637, Sigma Chemical CO, St. Louis, EUA, peso molecular 121.14), tris - pH 7,5, para o bloqueio da proteína inespecífica, permanecendo por uma hora em temperatura ambiente.

A incubação com os anticorpos primários por 18 horas a 4°C, conforme as diluições descritas no **Quadro 3**, foi efetuada após os cortes serem delimitados com caneta hidrofóbica (Dako Pen, S2002, Dako) em bandeja com tampa e lacrada com fita adesiva, precedida da remoção do excesso de leite das lâminas. Seguiram-se três lavagens com tris pH 7,5 por cinco minutos nos cortes.

Para a detecção da reação imuno-histoquímica foi empregado o sistema *NovoLink Max Polymer* (RE7260-K, Novocastra) para os anticorpos primários. Os sistemas *NovoLink Polymer Detection Systems* utilizam uma tecnologia nova de polimerização controlada, evitando o problema da coloração não específica. Permite a identificação qualitativa de antígenos por microscopia óptica.

O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante, que consistiu na incubação da primeira solução (*Post Primary Block*) por trinta minutos em temperatura ambiente. Seguido de três lavagens com tris pH 7,5 por cinco minutos e incubação com a segunda solução (*Polymer*) por 30 minutos. Seguiram-se três lavagens com tris pH 7,5 por cinco minutos.

Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com a solução de 3,3' diaminobenzidina (K3466, Liquid DAB, DakoCytomation Denmark S/A), durante sete minutos à temperatura ambiente. Seguindo-se lavagem com tris pH 7,5 e água destilada (três repetições de cinco minutos). Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, por 15 segundos. Sucederam-se lavagem em água corrente por cinco minutos, desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem em solução de bálsamo.

Em cada bateria de reação, foram acrescentados controles positivos e negativos. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no corte de carcinoma de células escamosas e um corte de sarcoide equino, sendo incubado somente o diluente.

### 3.5.1. Avaliação imuno-histoquímica dos índices de proliferação celular pelo Ki-67 e do índice apoptótico pela Caspase-3

A avaliação da imuno-reatividade anti-Ki-67 e anti-caspase-3, foi realizada conforme a marcação positiva. Foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos entre cinco campos aleatórios de 100 células tanto da porção epidérmica quanto dérmica do tumor utilizando-se de microscopia óptica. Para a expressão da caspase-3 foi considerada também a forma de marcação intra-citoplasmática, difusa e puntiforme.

Estes valores foram transformados em percentual de células positivas e submetidos à análise estatística.

### 3.5.1.2. Avaliação imuno-histoquímica pela expressão da p53

A avaliação descritiva para a imuno-reatividade anti-p53 foi realizada considerando-se os tipos celulares positivos conforme a marcação positiva e a localização da marcação nos fibroblastos dérmicos utilizando-se de microscopia óptica.

### 3.5.1.3 Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica

A avaliação histoquímica e imuno-histoquímica foram realizadas por meio de microscopia óptica modelo Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Alemanha), câmera digital modelo AxioCam MRC (Zeiss Vision, Alemanha) acoplada a um microcomputador. As imagens foram processadas pelo programa computacional Axiovision Software Rel. Versão 4.6.1 (Zeiss Vision, Alemanha), do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP. A objetiva utilizada foi a de 40x.

## 3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu – São Paulo.

Foram analisadas as estatísticas descritivas de frequência e a porcentagem das variáveis qualitativas, as quais incluíram as informações sobre a raça, o sexo, a idade e a pelagem dos animais acometidos, a localização das lesões de sarcoide equino, o tamanho das neoplasias, a multiplicidade das lesões e os tipos clínicos de sarcoide equino.

Para as variáveis quantitativas, foi feita análise de variância, sendo necessário utilizar transformações. Para as análises de número médio de NORs na derme segundo o tipo clínico, pelo método de análise de variância para a transformação raiz quadrada do número médio e para a variável relação Nors/Núcleo na derme e na epiderme, segundo o tipo clínico, pelo método de análise de variância. Para a variável quantitativa, proliferação celular pelo Ki-67 na derme e na epiderme, e a apoptose pela imunomarcagem pela caspase-3, segundo o tipo clínico, foi utilizada a análise de variância para a transformação arco seno da raiz quadrada.

Para a variável, de localização da expressão da p53 no sarcoide equino e a localização da p53 segundo a recidiva, sendo estas variáveis binárias, utilizou-se o método de regressão logística.

Quando detectadas diferenças significativas, foi realizado o teste de Tukey para comparação de pares de tipos clínicos de sarcoide equino, grau de significância  $p < 0,05$ .

Para a correlação de todas as variáveis realizadas neste projeto, foi feito o estudo de correlação linear entre pares de variáveis. Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson.

Para os cálculos, foi usado o programa SAS e R.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Dados clínicos dos animais

Das 41 amostras utilizadas no presente estudo, 40 casos foram possíveis de se obter informações sobre a raça sendo, nove animais da raça Quarto-de-Milha, seis animais Puro Sangue Inglês, seis animais da raça Mangalarga, três animais da raça Árabe, dois animais da raça Trakehner, dois eram Mini-horse, um American Trotter, um animal da raça Anglo Árabe, um Brasileiro de Hipismo, um animal da raça Campolina e oito animais sem raça definida (SRD) (**Tabela 1**).

Em relação ao sexo, entre as 41 amostras de sarcoide equino, 27 eram machos e 14 eram fêmeas (**Tabela 2**).

A idade dos animais variou de meses a 15 anos, sendo que 12 animais possuíam até dois anos. Dez animais tinham idade entre dois anos e cinco anos, 12 animais entre cinco e dez anos e quatro animais com mais de dez anos (**Tabela 3**). De três animais não foi possível obter dados sobre a idade.

A pelagem pode ser determinada em 22 equinos, sendo dez animais castanhos, cinco animais tordilhos, quatro animais alazões e três animais de pelagem pampa (**Tabela 4**).

A localização mais frequente foi à região da cabeça em 17 casos seguida dos membros em oito animais, na região cervical/escapular em três animais, no peito/axilas em seis animais, e em cinco animais na região paragenital. Um animal não teve a localização informada (**Tabela 5**). Destas localizações, três animais apresentavam lesões em mais de um local entre estes acima citados, representado como multifocais (**Tabela 5**). Das 41 amostras, 35 (85.37%) casos apresentaram lesões únicas e seis (14.63%) casos apresentaram lesões múltiplas de sarcoide equino.

Quanto ao tamanho das tumorações cutâneas nos animais portadores de sarcoide equino, 20 animais apresentavam neoplasia medindo mais do que dez centímetros, 18 animais mostraram a neoplasia medindo menos do que dois centímetros e três animais com o tamanho variando entre dois e quatro centímetros (**Tabela 6**). Deve-se ressaltar que os animais mais jovens, ou seja, com idade inferior a 10 anos, mostraram tumores com dimensões maiores.

Considerando-se a classificação clínica do sarcoide equino, 16 amostras eram do tipo clínico fibroblástico (**Figura 1**), nove do tipo clínico verrucoso (**Figura 2**), oito do

tipo clínico nodular, sete do tipo clínico misto e um animal apresentou sarcoide equino do tipo clínico oculto (**Tabela 7**).

TABELA 1. Distribuição por raça dos animais com sarcoide equino.

<i>Raça</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Mangalarga	6	15,00
Mini-horse	2	5,00
Puro-Sangue-Inglês	6	15,00
Quarto-de-Milha	9	22,50
Sem Raça Definida	8	20,00
Trakehner	2	5,00
Árabe	3	7,50
Outras	4	10,00
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>

TABELA 2. Sexo dos animais portadores de sarcoide equino.

<i>Sexo</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Fêmea	14	34,15
Macho	27	65,85
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100,00</b>

TABELA 3. Faixas etárias dos animais portadores de sarcoide equino.

<i>Idade (anos)</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
0-2	12	31,58
2,1-5	10	26,32
5,1-10	12	31,58
>10	4	10,53
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100,00</b>

TABELA 4. Pelagem dos animais portadores de sarcoide equino.

<i>Pelagem</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Alazã	4	18,18
Castanha	10	45,45
Pampa	1	4,55
Pampa-appaloosa	2	9,09
Tordilho	5	22,73
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>100,00</b>

TABELA 5. Localização anatômica das amostras de sarcoide sarcoide.

<i>Localização</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Cabeça	<b>17</b>	<b>42,50</b>
Membros	8	20,00
Cervical/Escapular	2	5,00
Torácico	1	2,50
Abdomen	3	7,50
Peito/Axilas	4	10,00
Paragenital	2	5,00
Multifocais	3	7,50
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>

TABELA 6. Tamanho das tumorações cutâneas nos animais portadores de sarcoide equino.

<i>Tamanho (cm)</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
<=2	18	43,90
2-4	3	7,32
>4	20	48,78
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>100</b>

TABELA 7. Número de amostras dos tipos clínicos de sarcoide equino.

<i>Tipo Clínico</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Fibroblástico	16	39,03
Misto	7	17,07
Nodular	8	19,51
Oculto	1	2,44
Verrucoso	9	21,95
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>



Figura 1. Equino, Puro Sangue Inglês, Macho, 5 anos. Pele. Sarcoide equino fibroblástico na face lateral do terço médio da região metatársica (seta a), e sarcoide equino verrucoso em face dorsal da porção distal da região metatársica (seta b).



Figura 2. Sarcoide equino verrucoso caracterizado por massa de tecido esbranquiçada de contornos irregulares.

#### 4.2. Morfologia microscópica

Todas as amostras foram analisadas para a presença ou ausência de figuras histológicas típicas as quais incluíram hiperplasia da epiderme e hiperqueratose, atrofia da epiderme, formação de *rete peg* (**Figura 3**) e de *picket fence* (**Figura 4**), ulceração parcial (**Tabelas 8 e 9**) e, para os critérios da porção dérmica, como a presença ou ausência de proliferação dos fibroblastos dérmicos, arranjo típico fasciculado e/ou em verticilos (**Figuras 5 e 6**) e presença de cisto folicular (**Tabelas 8 e 9**).

O componente epidérmico estava ausente em três sarcoide equino fibroblástico e um verrucoso mostrando-se macroscopicamente como não-epitelizados. Quase todos os tipos clínicos, verrucoso, misto e nodular apresentaram as alterações típicas em seus componentes epidérmicos e dérmicos. A formação de *rete peg* estava frequentemente associada à hiperplasia do epitélio. Os tipos clínicos fibroblástico, geralmente, apresentavam úlcera associada à infiltração de polimorfonucleares. A atrofia da epiderme foi frequentemente observada no tipo clínico nodular com ausência de folículos pilosos e de glândulas sudoríparas, assim como o “amoldamento” da epiderme e dos folículos pilosos (**Figuras 7 e 8**). Na única amostra do tipo clínico oculto, não foi observada a formação de *rete peg*. A celularidade pela proliferação dos fibroblastos dérmicos estava presente em todos os casos de sarcoide equino, e por vezes mostrava-se densa (**Figura 6**). Houve a observação de fibroblastos com o citoplasma mais “alongado” no tipo clínico verrucoso (**Figura 9**). A presença de células multinucleadas estava em dois sarcoides do tipo fibroblástico. Houve a associação com habronemose apenas em um tipo clínico fibroblástico (**Figura 10**). Ectasia linfática foi observada em três casos sendo um caso do tipo clínico verrucoso, um do misto e um de fibroblástico. Observou-se a formação de pseudo-cápsula (**Figura 11**) em uma amostra do tipo clínico nodular e uma do misto. Nos tipos clínicos fibroblástico (**Figuras 12**) e verrucoso (**Figuras 13**) foram observadas a proliferação homogênea de vasos sanguíneos na porção dérmica das projeções exofíticas do tumor. Nas proximidades de focos inflamatórios, ulcerações ou tecido de granulação, a porção mesenquimal do tumor adquire arranjo mixoide (**Figura 14**). No tipo clínico verrucoso a epiderme mostrava alternadamente áreas de atrofia e hiperplasia (**Figura 15**) e hiperplasia quando presente mostrava-se regular (**Figura 16**). Em quatro casos mistos, quatro nodulares e um verrucoso foram observados a formação de cistos foliculares, ou *plugs* córneos (**Figura 17**). O sarcoide equino por

vezes mostra-se infiltrativo para musculatura (**Figura 18**) e com a celularidade dérmica com arranjo em verticilos (**Figura 19**).

TABELA 8. Alterações morfológicas na epiderme do sarcoide equino, entre os diferentes tipos, segundo critérios de Martens et al. (2000).

<b>Alterações na epiderme</b>	<b>Fibroblástico n=12*</b>	<b>Misto n=7</b>	<b>Nodular n=8</b>	<b>Oculto n=1</b>	<b>Verrucoso n=7*</b>
Hiperceratose	9	7	8	1	6
Atrofia	3	1	5	-	5
Hiperplasia	9	6	6	-	7
Rete peg	10	7	8	-	6
Picket fence	7	6	8	1	5
Úlcera parcial	7	8	7	1	9

\*Somente em sarcoide equino com a presença da superfície epidérmica

TABELA 9. Alterações morfológicas na parte dérmica entre os diferentes tipos de sarcoide equino, de acordo com os critérios utilizados por Martens et al. (2000).

<b>Alterações na derme</b>	<b>Fibroblástico n=16</b>	<b>Misto n=7</b>	<b>Nodular n=8</b>	<b>Oculto n=1</b>	<b>Verrucoso n=9</b>
Densidade dos fibroblastos	16	7	8	1	9
Arranjo típico	14	7	7	1	9
Cisto folicular	-	4	4	-	1



Figura 3. Fotomicrografia mostrando a formação de *rete peg* (setas). Hematoxilina e Eosina.

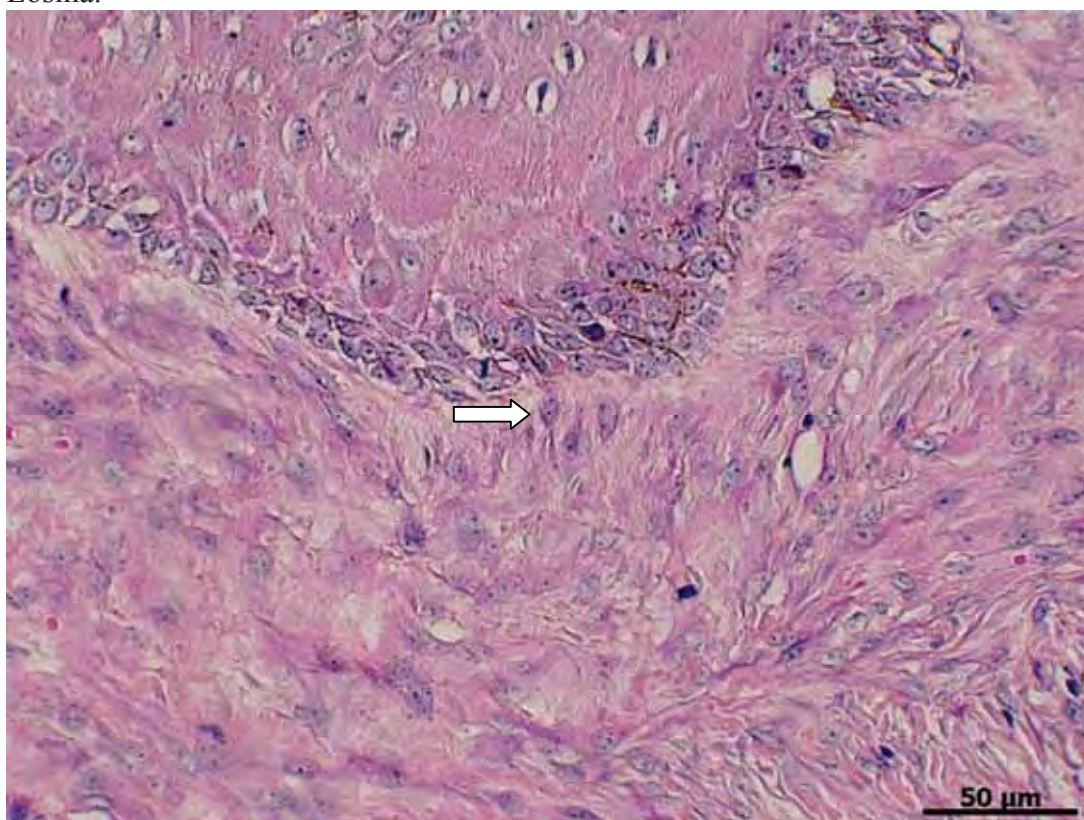


Figura 4. Fotomicrografia mostrando o posicionamento perpendicular dos fibroblastos em relação à epiderme, *picket fence* (seta), Hematoxilina e Eosina.

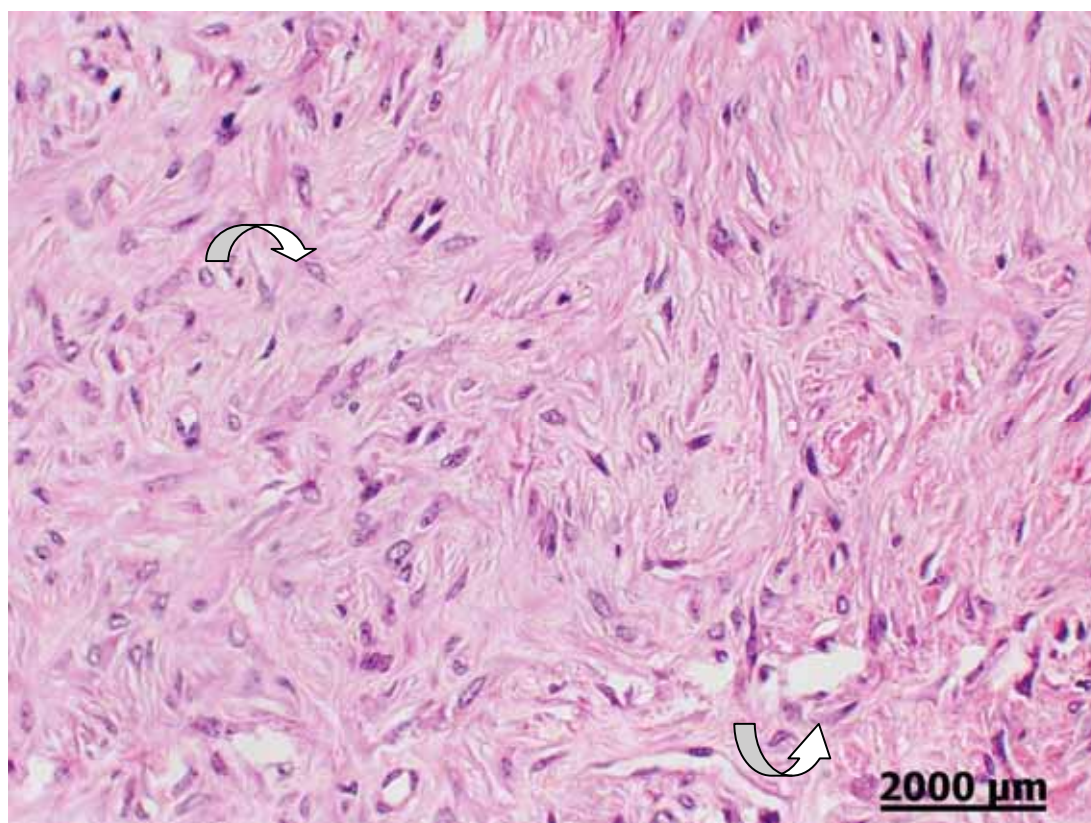


Figura 5. Fotomicrografia mostrando o tipo clínico verrucoso com arranjo em verticilos dos fibroblastos (setas), Hematoxilina e Eosina.

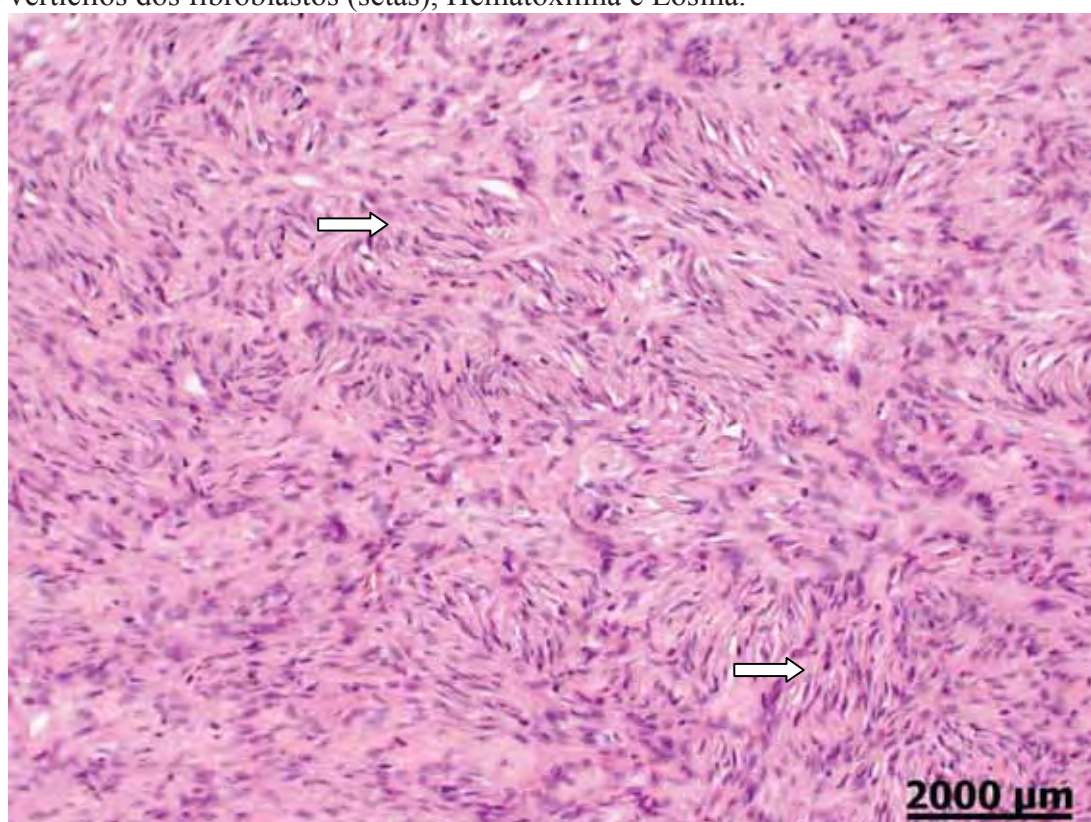


Figura 6. Fotomicrografia mostrando a proliferação dos fibroblastos dérmicos com alta celularidade e arranjo fasciculado (setas), Hematoxilina e Eosina.

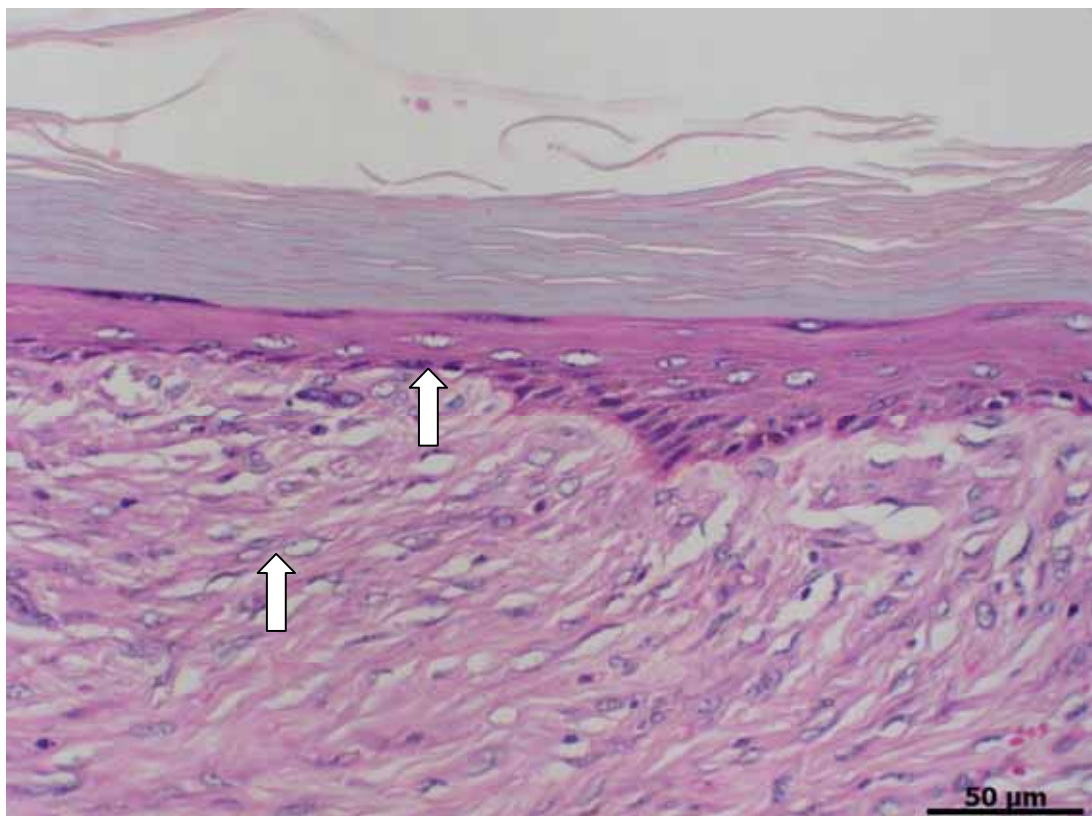


Figura 7. Fotomicrografia mostrando a atrofia da epiderme e a ausência de folículos pilosos e de glândulas sudoríparas no tipo clínico nodular (setas), Hematoxilina e Eosina.

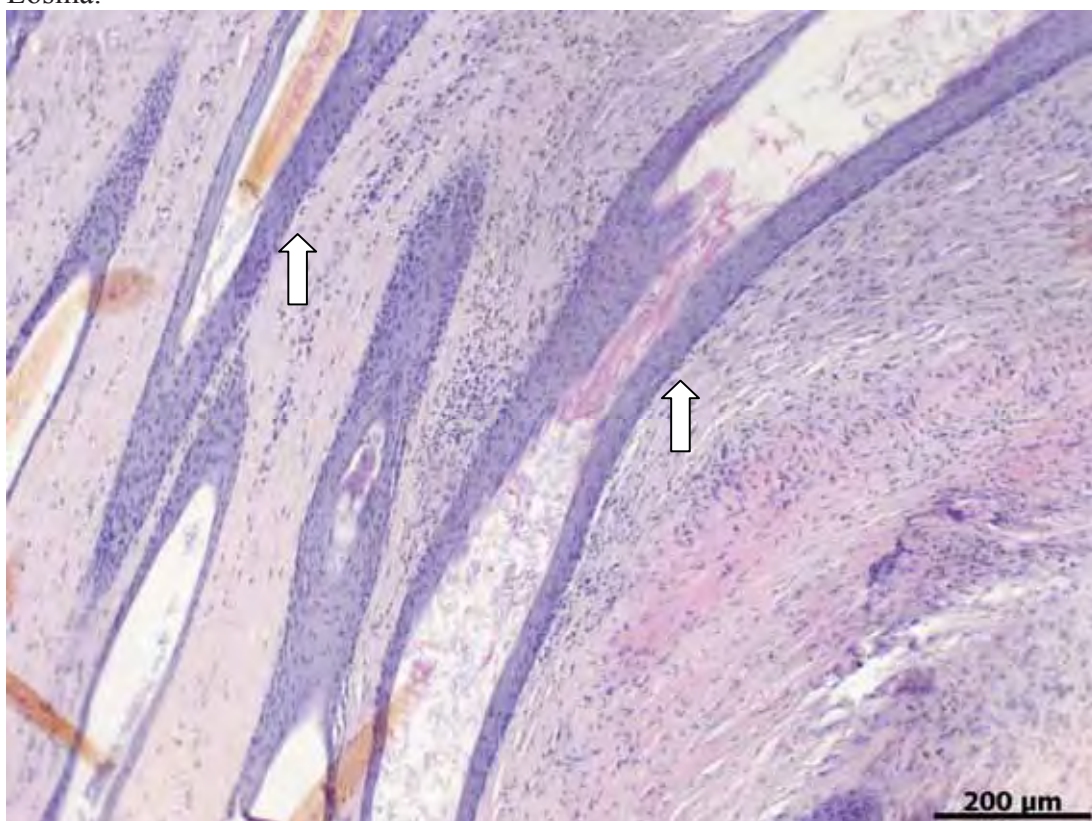


Figura 8. Fotomicrografia mostrando o “amoldamento” dos folículos pilosos em relação à derme no sarcoide equino nodular (setas). Hematoxilina e Eosina.

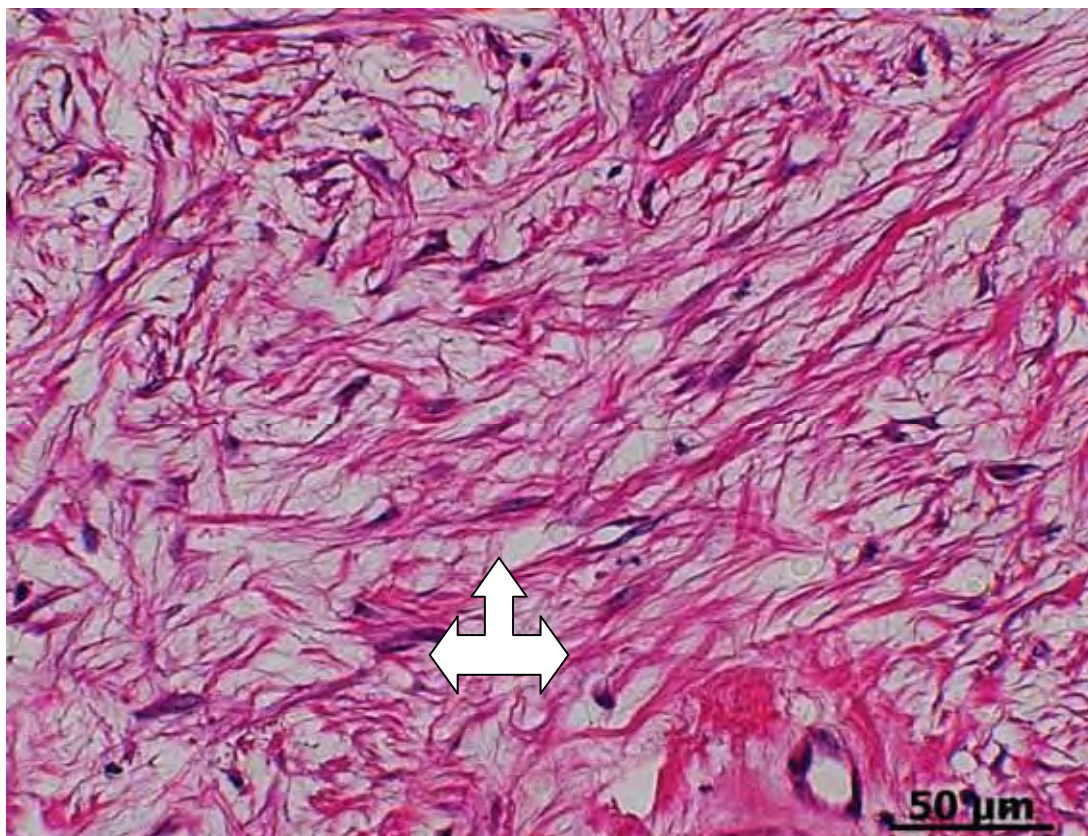


Figura 9. Fotomicrografia mostrando os fibroblastos com citoplasma mais “alongado” no tipo clínico verrucoso (seta), Hematoxilina e Eosina.

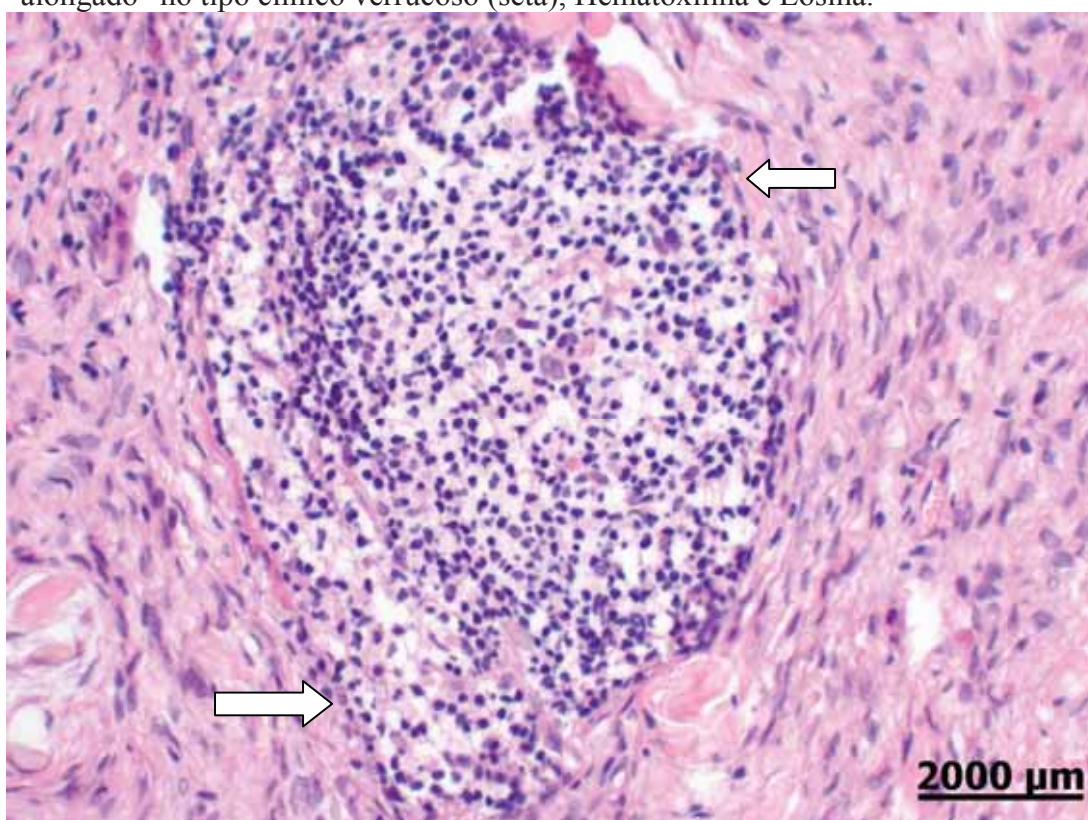


Figura 10. Fotomicrografia mostrando sarcoide equino associado a processo inflamatório relacionado à habronemose (setas), Hematoxilina e Eosina.

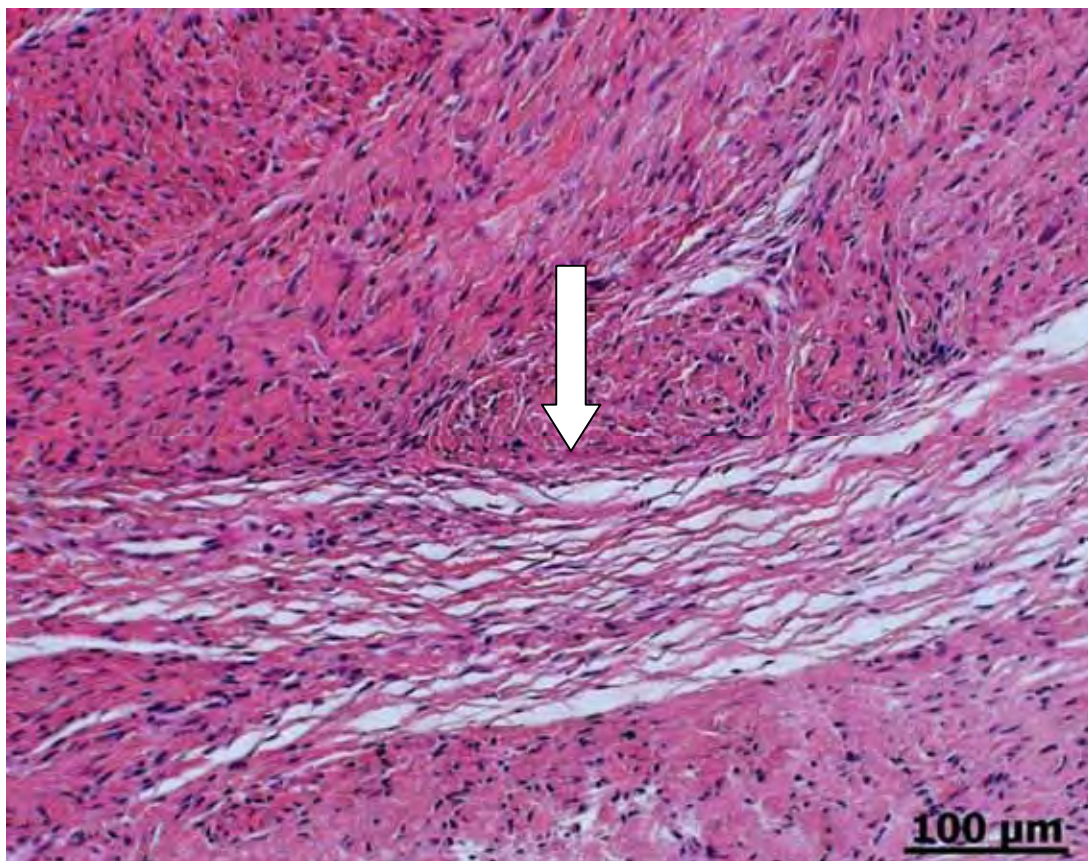


Figura 11. Fotomicrografia mostrando a formação de pseudo-cápsula (seta) em sarcoide equino do tipo clínico nodular, Hematoxilina e Eosina.

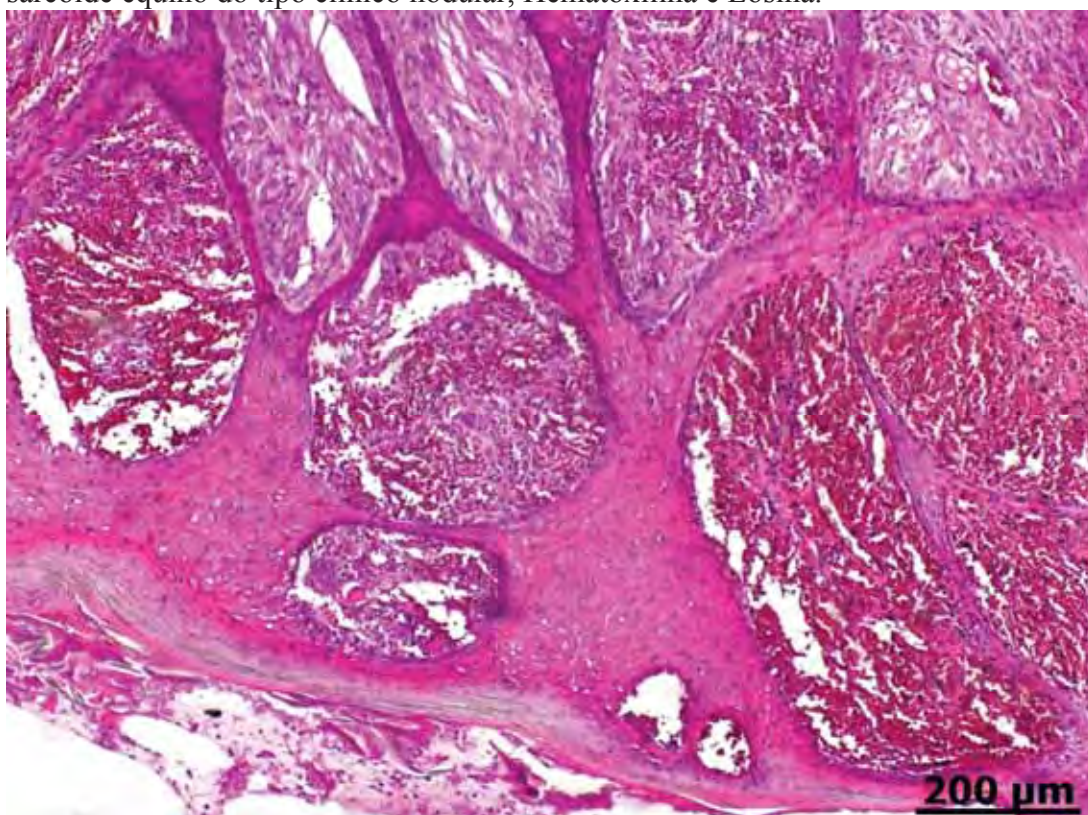


Figura 12. Fotomicrografia mostrando a proliferação homogênea de vasos sanguíneos nas projeções exofíticas do tipo clínico fibroblástico, Hematoxilina e Eosina.

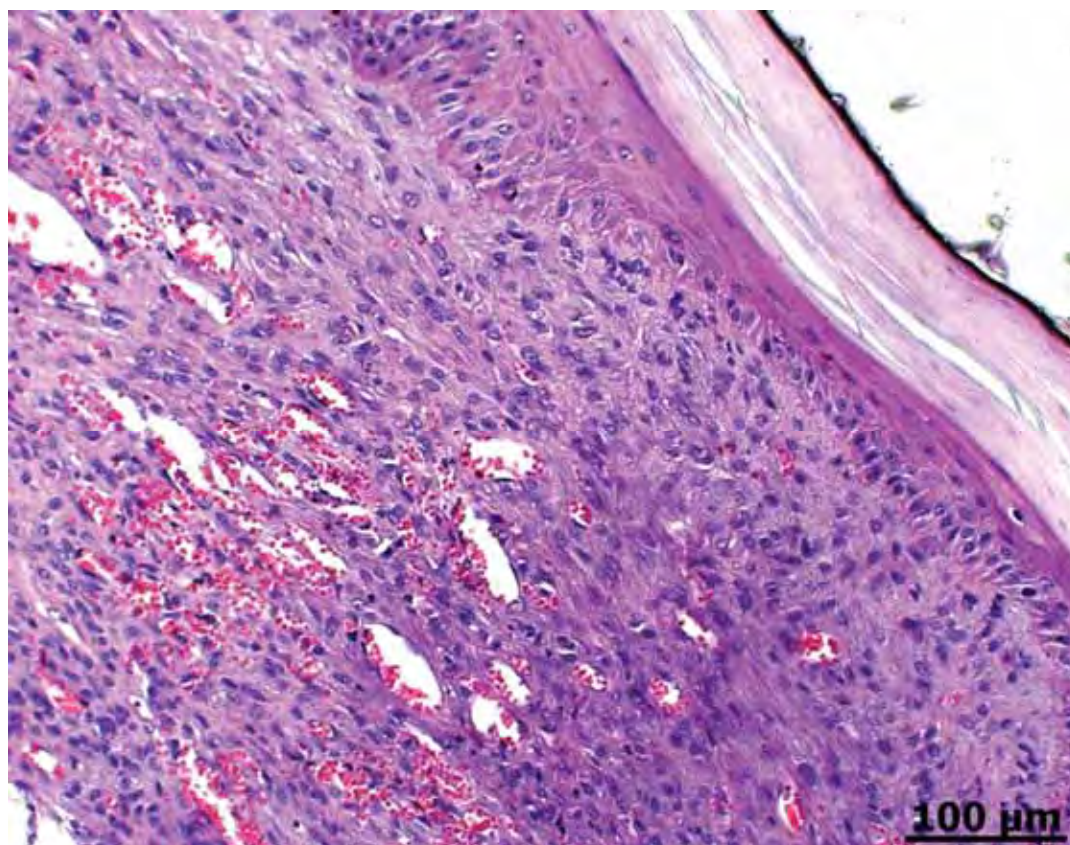


Figura 13. Fotomicrografia detalhando a proliferação homogênea de vasos sanguíneos na projeção exofítica do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.

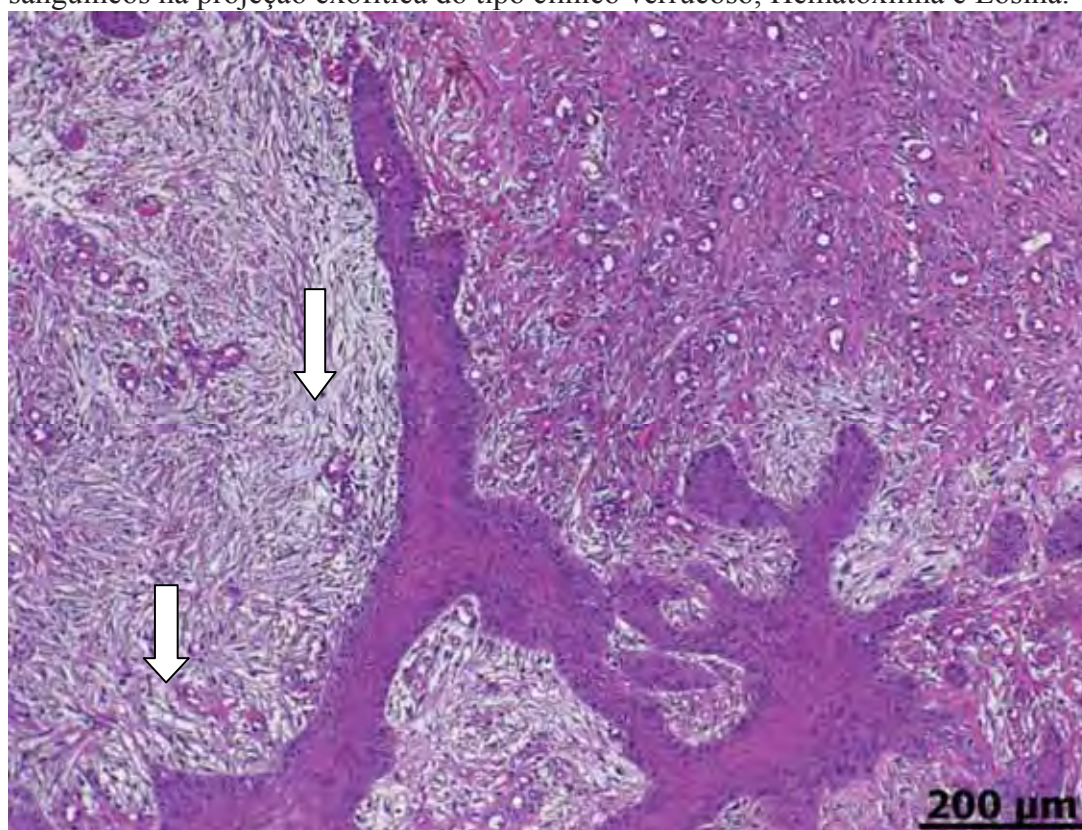


Figura 14. Fotomicrografia mostrando o arranjo mixoide que os fibroblastos do sarcoide equino adquirem nas proximidades de focos inflamatórios (setas), Hematoxilina e Eosina.

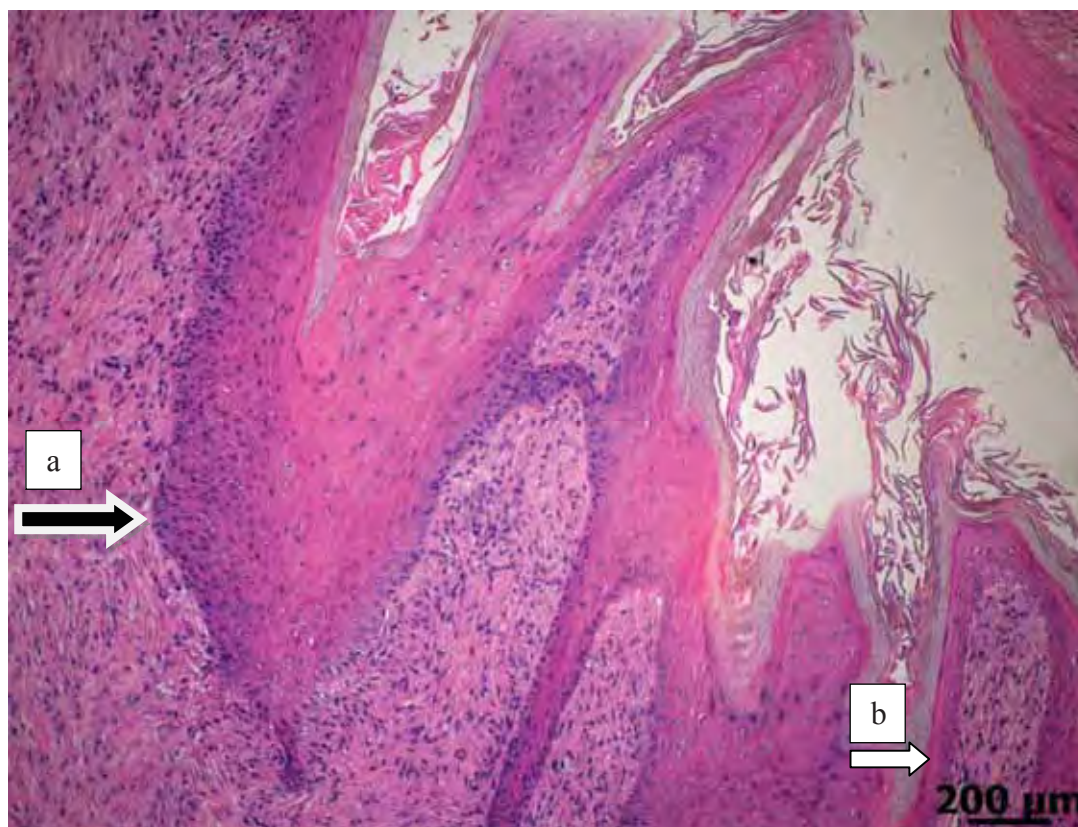


Figura 15. Fotomicrografia mostrando as áreas alternadas de epitélio acantótico (seta a) e atrófico (seta b) nas projeções exofíticas do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.



Figura 16. Fotomicrografia mostrando as áreas de hiperplasia regular no epitélio acantótico e atrófico (setas) das projeções exofíticas do tipo clínico verrucoso, Hematoxilina e Eosina.

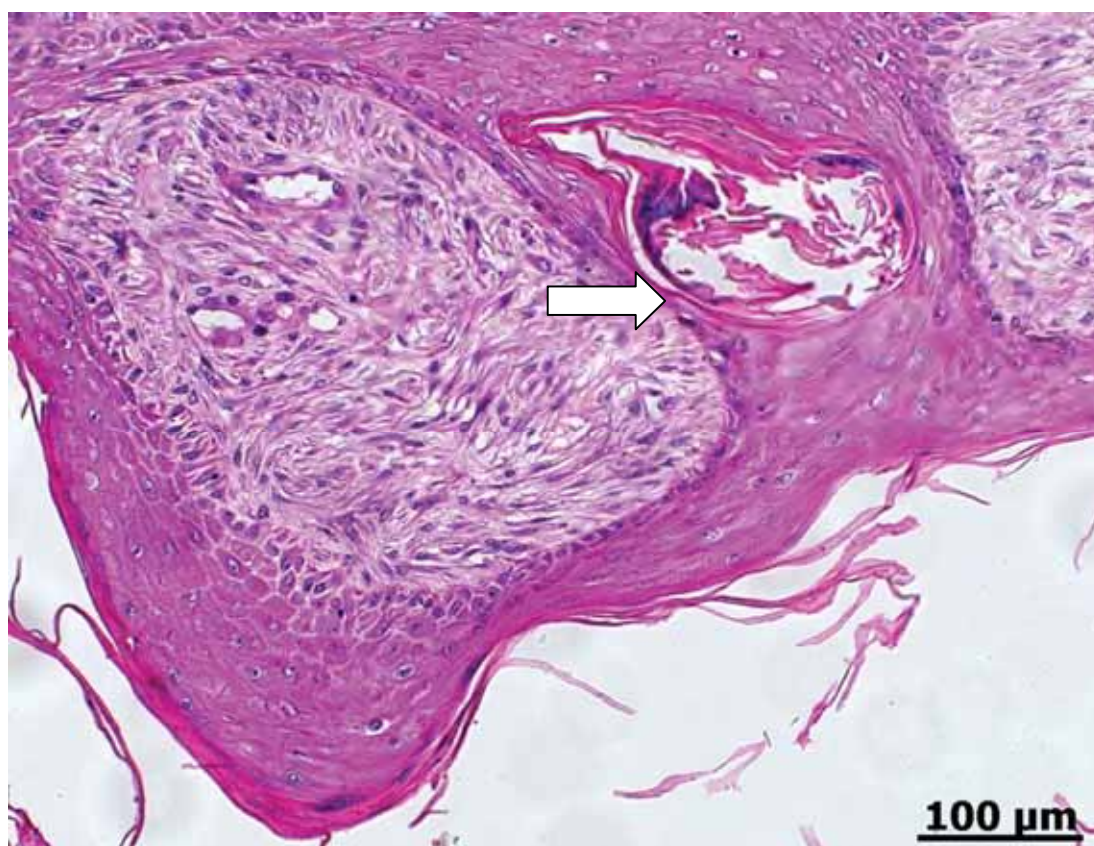


Figura 17. Fotomicrografia mostrando sarcoide equino verrucoso frequentemente associado a *plugs* córneos (seta), Hematoxilina e Eosina.

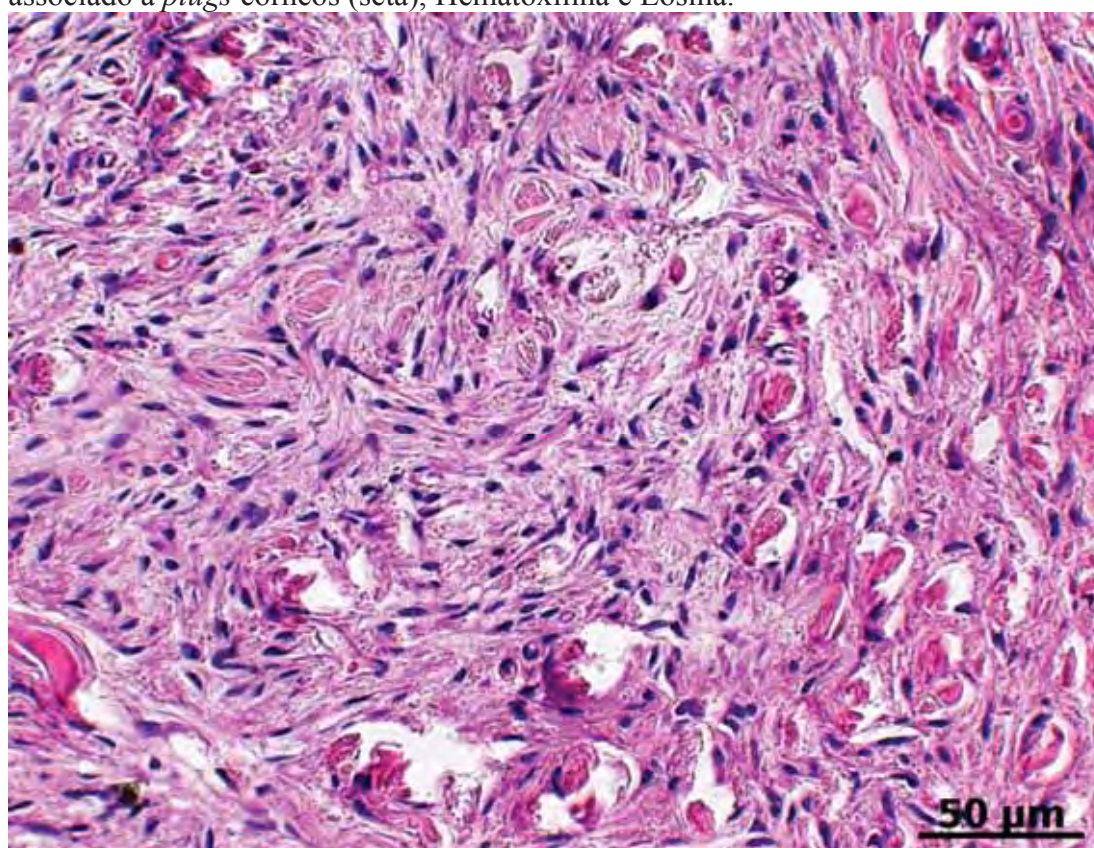


Figura 18. Fotomicrografia mostrando a capacidade invasiva dos fibroblastos neoplásicos do sarcoide equino infiltrando à musculatura adjacente, Hematoxilina e Eosina.

#### 4.3. Tipo clínico

Quando consideramos a raça, predominantemente, nos diferentes tipos clínicos vemos que o tipo clínico fibroblástico apresentou maior frequência de acometimento na raça Quarto-de-Milha com cinco casos, seguida de cinco animais sem raça definida no tipo misto e três animais Puro Sangue Inglês com o tipo nodular (**Tabela 10**). Em relação ao sexo, 11 animais machos apresentavam o tipo fibroblástico e 12 animais machos apresentavam seis o tipo clínico misto e seis, o tipo verrucoso. Quanto às fêmeas, houve o predomínio de cinco animais com o tipo fibroblástico, seguidas de quatro éguas com o tipo nodular (**Tabela 10**). Os animais até dois anos de idade foram predominantes no tipo clínico fibroblástico com sete casos, seguidos de quatro animais com mais de cinco e menos de 10 anos (**Tabela 10**). Houve o predomínio de animais de pelagem castanha, com seis animais do tipo clínico fibroblástico e quatro animais do tipo fibroblástico de pelagem tordilho. A multiplicidade de lesões foi predominante no tipo verrucoso e no tipo fibroblástico predominaram lesões únicas no corpo dos animais (**Tabela 10**).

D  
(  
(  
(

Em relação ao tamanho das amostras de acordo com o tipo clínico de sarcoide equino, as amostras com menos de dois centímetros e acima de quatro centímetros foram predominantes no tipo clínico fibroblástico, com sete casos em cada. Em seguida, quatro amostras com menos de quatro centímetros no tipo nodular e quatro amostras no tipo verrucoso, assim como também quatro amostras acima de quatro centímetros nos tipos clínicos, misto e verrucoso (**Tabela 11**) (**Figura 19**).





TABELA 11. Número (n) e percentual (%) do tamanho das amostras de acordo com o tipo clínico de sarcoide equino.

Característica	Tipo Clínico					
	Fibroblástico	Misto	Nodular	Oculto	Verrucoso	Total
Tamanho	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<2 cm	7 (17,07)	3 (7,32)	4 (9,76)	-	4 (9,76)	<b>18 (43,90)</b>
2-4 cm	2 (4,88)	-	-	-	1 (2,44)	<b>3 (7,32)</b>
>4 cm	7 (17,07)	4 (9,76)	4 (9,76)	1 (2,44)	4 (9,76)	<b>20 (48,78)</b>
<b>Total</b>	<b>16 (39,02)</b>	<b>7 (17,07)</b>	<b>8 (19,51)</b>	<b>1 (2,44)</b>	<b>9 (21,95)</b>	<b>41 (100,00)</b>

Em relação à localização das lesões por tipo clínico, o tipo clínico fibroblástico localizou-se preferencialmente na cabeça em sete casos do total de 17 casos, seguida dos membros com quatro casos. Os tipos clínicos misto, nodular e verrucoso também se apresentaram tendo a cabeça como a localização mais frequente, com três casos, três casos e quatro casos, respectivamente. Nos membros, houve o predomínio do tipo clínico fibroblástico com quatro casos e verrucoso com dois casos. Em um dos casos não foi informada a localização da lesão (**Tabela 12**).

TABELA 12. Localização das amostras de sarcoide equino, segundo o tipo clínico.

Localização	Tipo Clínico					
	Fibroblástico	Misto	Nodular	Oculto	Verrucoso	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Cabeça	7 (17,50)	3 (7,50)	3 (7,50)	-	4 (10,00)	<b>17 (42,50)</b>
Membros	4 (10,00)	2 (5,00)	-	-	2 (5,00)	<b>8 (20,00)</b>
Cervical/Escapular	-	-	1 (2,50)	-	1 (2,50)	<b>2 (5,00)</b>
Torácico	1 (2,50)	-	-	-	-	<b>1 (2,50)</b>
Abdomen	1 (2,50)	1 (2,50)	1 (2,50)	-	-	<b>3 (7,50)</b>
Peito/Axilas	1 (2,50)	1 (2,50)	2 (5,00)	-	-	<b>4 (10,00)</b>
Genital	1 (2,50)	-	1 (2,50)	-	-	<b>2 (5,00)</b>
Multifocais	2 (5,00)	-	-	1 (2,50)	1 (2,50)	<b>4 (10,00)</b>
<b>Total</b>	<b>15 (41,50)</b>	<b>7 (17,50)</b>	<b>8 (19,00)</b>	<b>1 (2,50)</b>	<b>7 (17,50)</b>	<b>41 (100,00)</b>

Mediana   
Primeiro e terceiro quartil   
Valores Plausíveis   
Valor extremo 

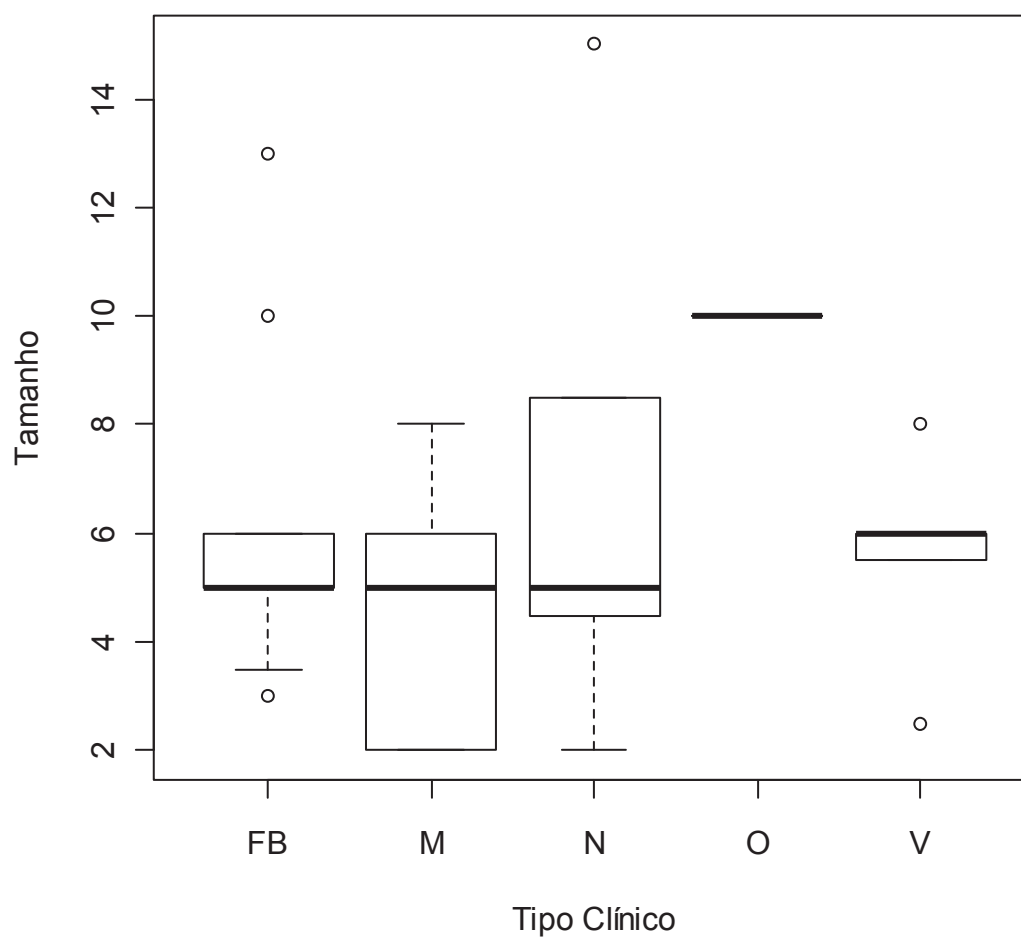


Figura 19. Tamanho das tumorações cutâneas nos animais portadores de sarcoide equino, segundo o tipo clínico, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.

#### 4.3.1. Índice de proliferação celular pelo método de AgNORs

A contagem de AgNOR foi realizada em todas as 41 amostras de sarcoide equino. No presente estudo os AgNORs estavam presentes na grande maioria das células da porção dérmica do tumor, mostrando-se como pontos escuros solitários ou múltiplos dispersos aleatoriamente no interior do núcleo (**Figura 20**), e na porção epidérmica do tumor, predominantemente como pontos solitários e centrais. Assim sendo, obtivemos uma média de número de pontos de NORs por núcleo de células neoplásicas, assim como a média da área medida dos pontos de NORs e a média da área do núcleo em  $\mu\text{m}^2$ , tanto da porção epidérmica quanto da porção dérmica do tumor (**Tabela 13**). Foi excluído desta avaliação o tipo clínico oculto por ser representado por apenas um caso.

Entre os diferentes tipos de sarcoide equino, embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), a média da área de NORs por núcleos na derme foi maior no tipo clínico fibroblástico (2,28), seguido pelo tipo clínico nodular (2,09), misto (1,83) e pelo tipo clínico verrucoso (1,55) (**Tabela 13**). Em relação à epiderme, a média da área de NORs por núcleos foi maior no tipo clínico misto (4,45), seguido do tipo clínico fibroblástico (4,05), nodular (3,21) e pelo tipo clínico verrucoso (2,94) (**Tabela 13**). Quanto ao número de NORs, a maior média encontrada na derme foi no tipo misto (2,44), seguida dos tipos clínicos, nodular (2,32) e verrucoso (2,21). O tipo fibroblástico apresentou a menor média de NORs por células na derme (2,10). Em relação à epiderme, o tipo clínico misto teve a maior média de número de NORs (2,07), seguida do tipo clínico fibroblástico (1,90), e média semelhante entre o tipo clínico nodular (1,86) e verrucoso (1,84). A média da relação entre a área do NOR e a área do núcleo foi igual entre os tipos clínicos fibroblástico, misto e nodular com 0,04 e a menor média no tipo clínico verrucoso (0,03), na derme do sarcoide equino. Na epiderme, a média de relação foi maior nos tipos fibroblástico e misto com 0,07, seguida do tipo nodular com 0,06 e verrucoso com média de 0,05 (**Figuras 21, 22 e 23**).

TABELA 13. Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do número de AgNORs e da relação da área dos NORs com a área do núcleo das células, entre os tipos clínicos de sarcoide equino.

AgNOR	N	Área do Núcleo na derme (um <sup>2</sup> )		Área do Nor na derme (um <sup>2</sup> )		Número do Nor por célula na derme		Relação Nor/Núcleo na derme	
		X	(DP)	X	(DP)	X	(DP)	X	(DP)
Fibroblástico	16	52,27 a <sup>1</sup>	(15,71)	2,28 a	(0,96)	2,10 a	(0,23)	0,04 a	(0,01)
Misto	7	43,60 a	(15,39)	1,90 a	(0,70)	2,44 a	(1,07)	0,04 a	(0,02)
Nodular	8	53,36 a	(20,00)	2,09 a	(0,55)	2,32 a	(0,70)	0,04 a	(0,01)
Verrucoso	9	49,20 a	(10,21)	1,60 a	(0,60)	2,21 a	(0,86)	0,03 a	(0,01)
AgNOR	N	Área do Núcleo na epiderme (um <sup>2</sup> )		Área do Nor na epiderme (um <sup>2</sup> )		Número de Nor por célula na epiderme		Relação Nor/Núcleo na derme	
Fibroblástico	8	53,30 a	(13,60)	4,05 a	(1,70)	1,90 a	(0,20)	0,07 a	(0,01)
Misto	4	56,08 a	(5,23)	4,45 a	(1,12)	2,07 a	(0,08)	0,07 a	(0,01)
Nodular	6	49,61 a	(7,90)	3,21 a	(0,72)	1,86 a	(0,26)	0,06 a	(0,01)
Verrucoso	6	50,61 a	(8,84)	2,94 a	(0,74)	1,84 a	(0,16)	0,05 a	(0,01)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

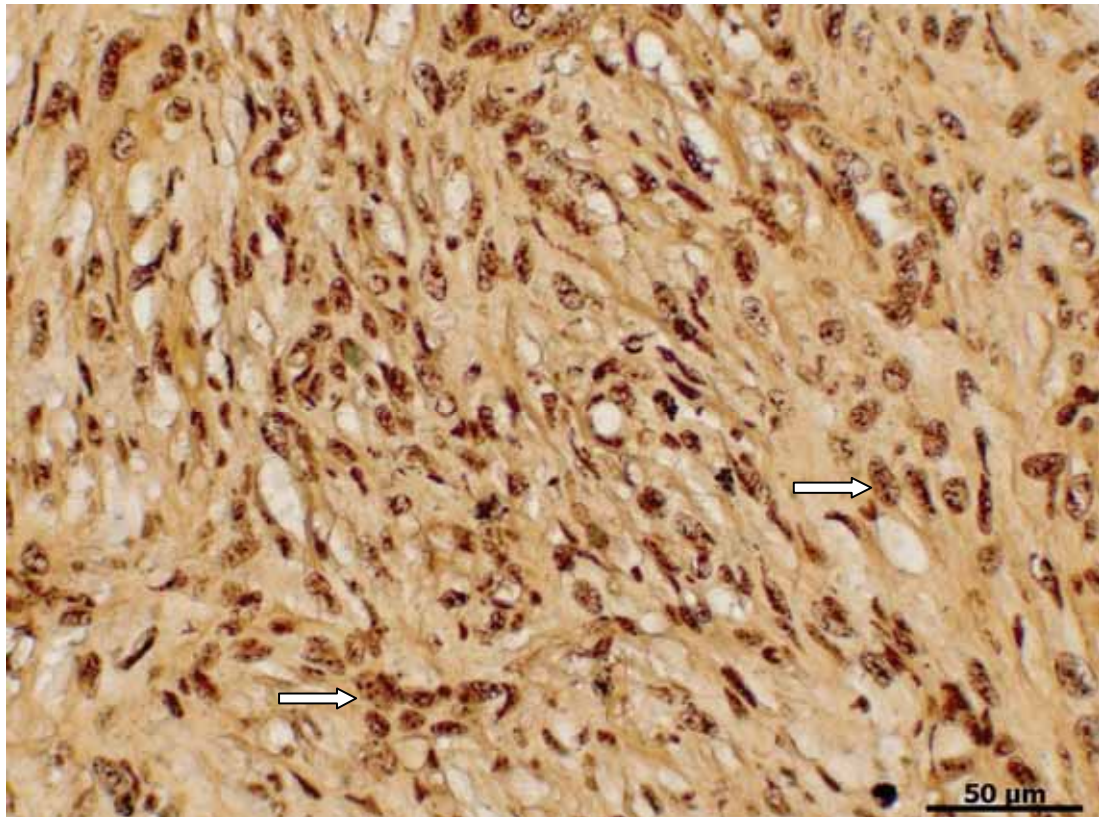






Figura 20. Fotomicrografia mostrando os fibroblastos dérmicos com pontos de NORs múltiplos no interior do núcleo (setas). AgNOR, contra-coloração: verde luz.

Mediana   
 Primeiro e terceiro quartil   
 Valores Plausíveis   
 Valor extremo 

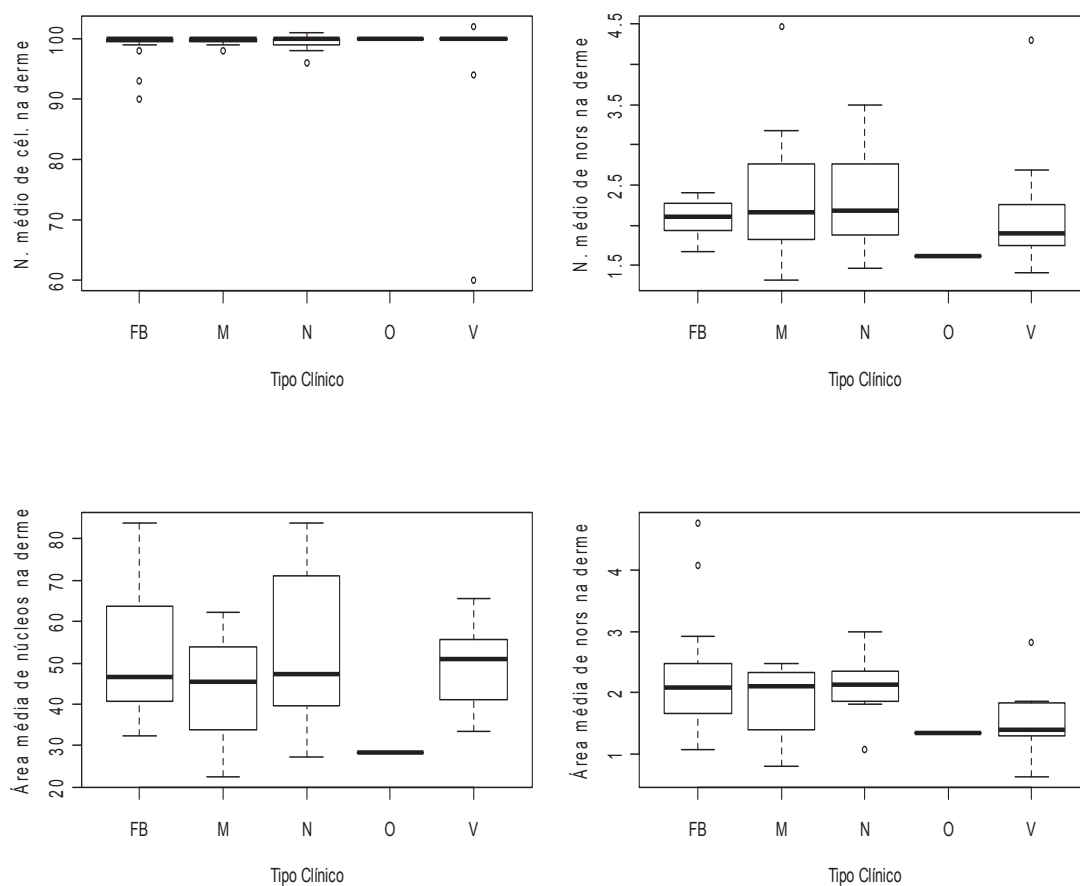






Figura 21. Número de Nors nas células e a área média do núcleo celular ( $\text{um}^2$ ) na derme, segundo o tipo clínico de sarcóide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.

Mediana   
 Primeiro e terceiro quartil   
 Valores Plausíveis   
 Valor extremo 

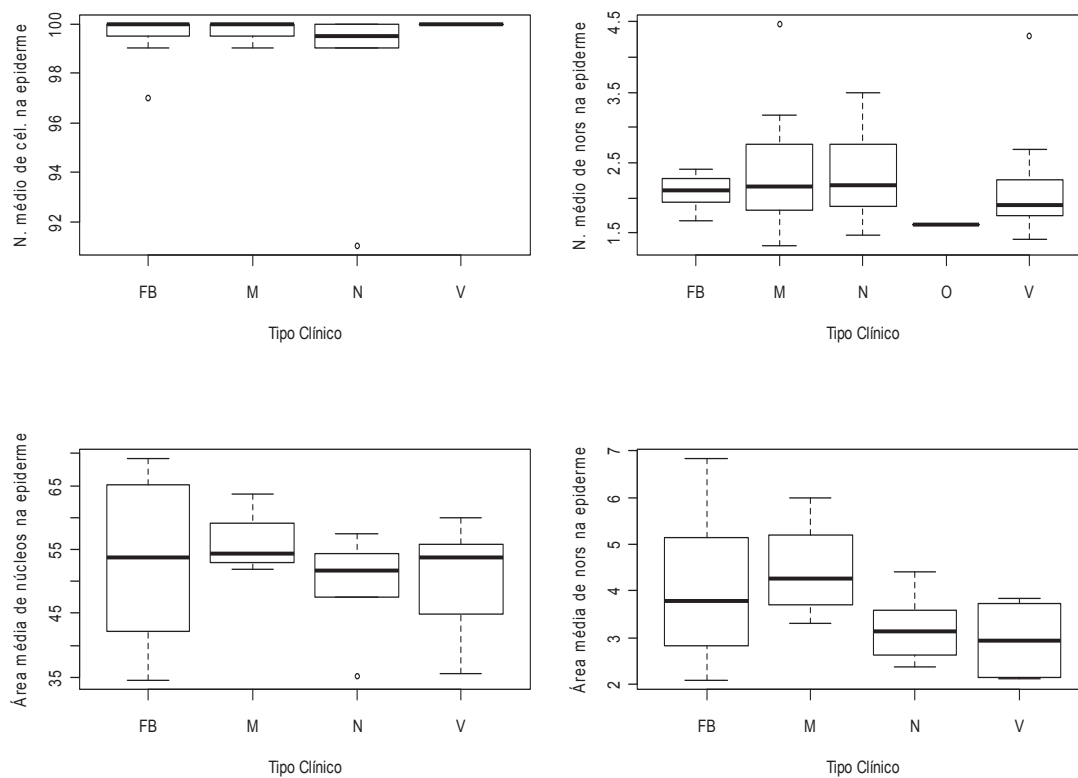


Figura 22. Número de Nors nas células e a área média o núcleo celular ( $\text{um}^2$ ) na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcóide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.

Mediana   
 Primeiro e terceiro quartil   
 Valores Plausíveis ———  
 Valor extremo ○

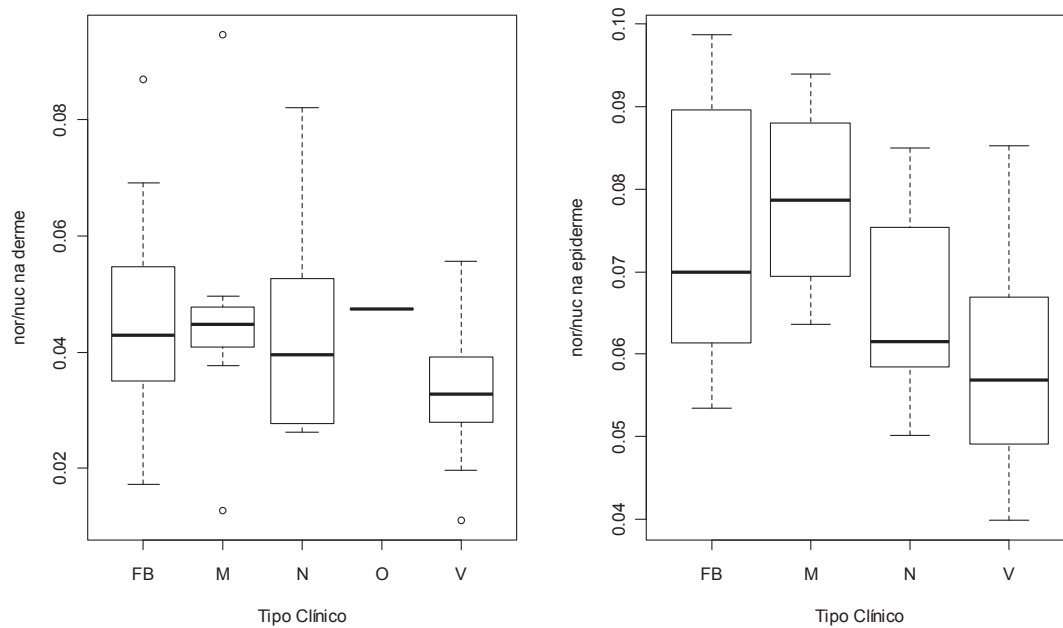


Figura 23. A média da relação de Nors nas células pela área média dos núcleos celulares ( $\text{um}^2$ ) na derme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.

#### 4.3.2. Índice de proliferação celular pelo método de Ki-67 (MIB-1)

Quando analisada a taxa de proliferação celular, pode ser observado que embora não tenha significado estatístico, na derme, o tipo clínico nodular apresenta a maior média com 0,20 seguida do tipo clínico fibroblástico com média de 0,16, em seguida, o tipo clínico verrucoso com 0,15 e o tipo clínico misto com 0,14 (**Tabela 14**). Na epiderme, o tipo clínico misto apresenta a maior média com 0,22 seguida do tipo clínico fibroblástico com média de 0,18, em seguida, o tipo clínico verrucoso com 0,15 e o tipo clínico nodular com 0,13 (**Figura 26**). A figura 24 mostra a imuno-marcação positiva do Ki-67 nos fibroblastos do sarcoide equino. Foi excluído desta avaliação o tipo clínico oculto por ser representado por apenas um caso.

TABELA 14. Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do índice de proliferação celular utilizando o anticorpo anti-Ki-67 (MIB 1), segundo o tipo clínico de sarcoide equino.

Ki-67	N	Derme		N	Epiderme	
		X	DP		X	DP
Fibroblástico	16	0,16 a <sup>1</sup>	(1,59)	9	0,18 a	(0,16)
Misto	7	0,14 a	(0,10)	4	0,22 a	(0,16)
Nodular	8	0,20 a	(0,11)	7	0,13 a	(0,09)
Verrucoso	9	0,15 a	(0,16)	5	0,15 a	(0,17)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

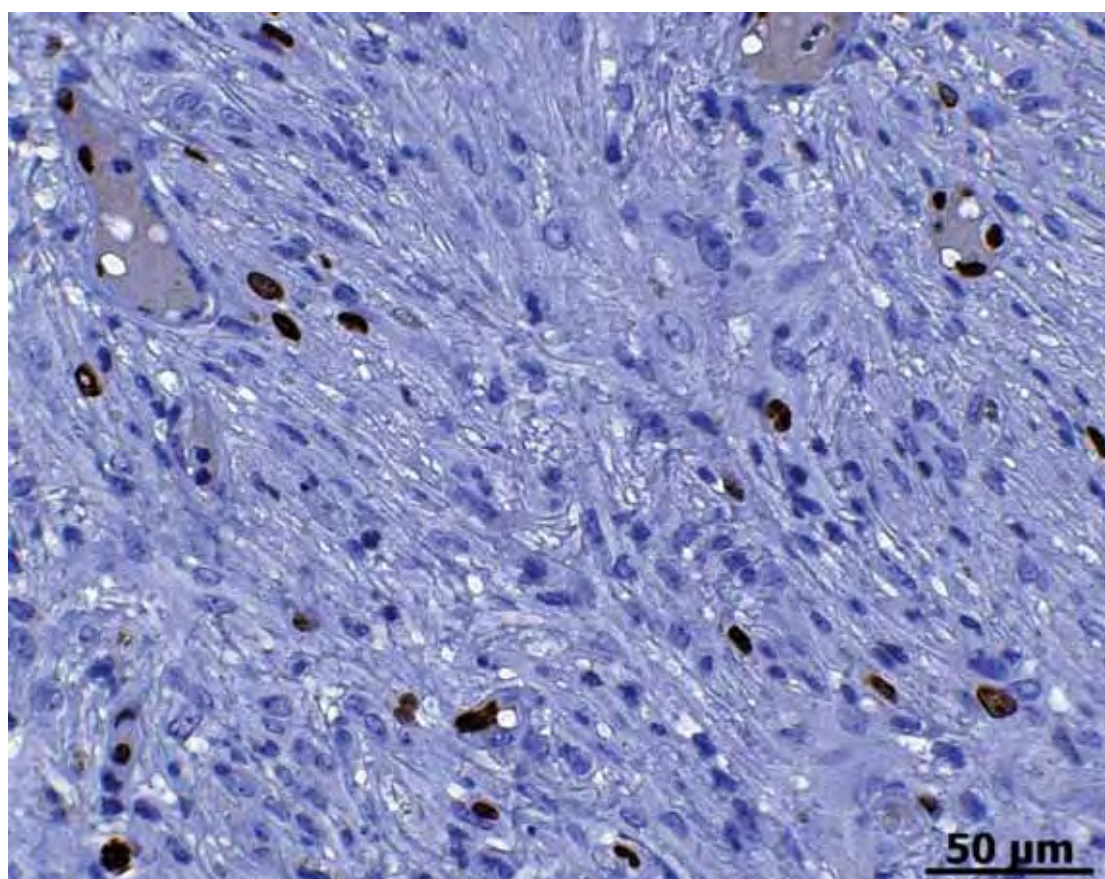


Figura 24. Fotomicrografia mostrando a imuno-marcação para Ki-67. Positividade em fibroblastos em proliferação. Imuno-histoquímica, Ki-67, 1:100, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

### 4.3.3. Índice de apoptose pelo método da caspase-3

Em relação à expressão de caspase-3, notou-se que entre os diferentes tipos clínicos na derme, o índice apoptótico foi maior para o sarcoide fibroblástico com 0,19, seguido do tipo nodular com 0,12, do tipo misto com 0,03 e do tipo verrucoso com 0,01. A diferença entre o tipo fibroblástico e os tipos misto e verrucoso foi estatisticamente significativa, assim como a diferença entre o nodular e verrucoso (**Tabela 15**). Na epiderme, não foi detectada diferença estatística significativa das médias entre os tipos clínicos fibroblástico, nodular e verrucoso (**Figura 26**). A figura 25 mostra a forma de marcação difusa e puntiforme nos fibroblastos do sarcoide equino. Foi excluído desta avaliação o tipo clínico oculto por ser representado por apenas um caso.

TABELA 15. Número de casos (N), média (X) e desvio padrão (DP) do índice apoptótico utilizando o anticorpo anti-caspase-3, segundo o tipo clínico de sarcoide equino.

Caspase-3	N	Derme		N	Epiderme	
		X	DP		X	DP
Fibroblástico	14	0,19 a <sup>1</sup>	(0,17)	10	0,01 a	(0,01)
Misto	7	0,03 b,c	(0,01)	4	0,00 a	(0,00)
Nodular	7	0,12 a,b	(0,07)	6	0,01 a	(0,01)
Verrucoso	9	0,01 c	(0,19)	6	0,01 a	(0,02)

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

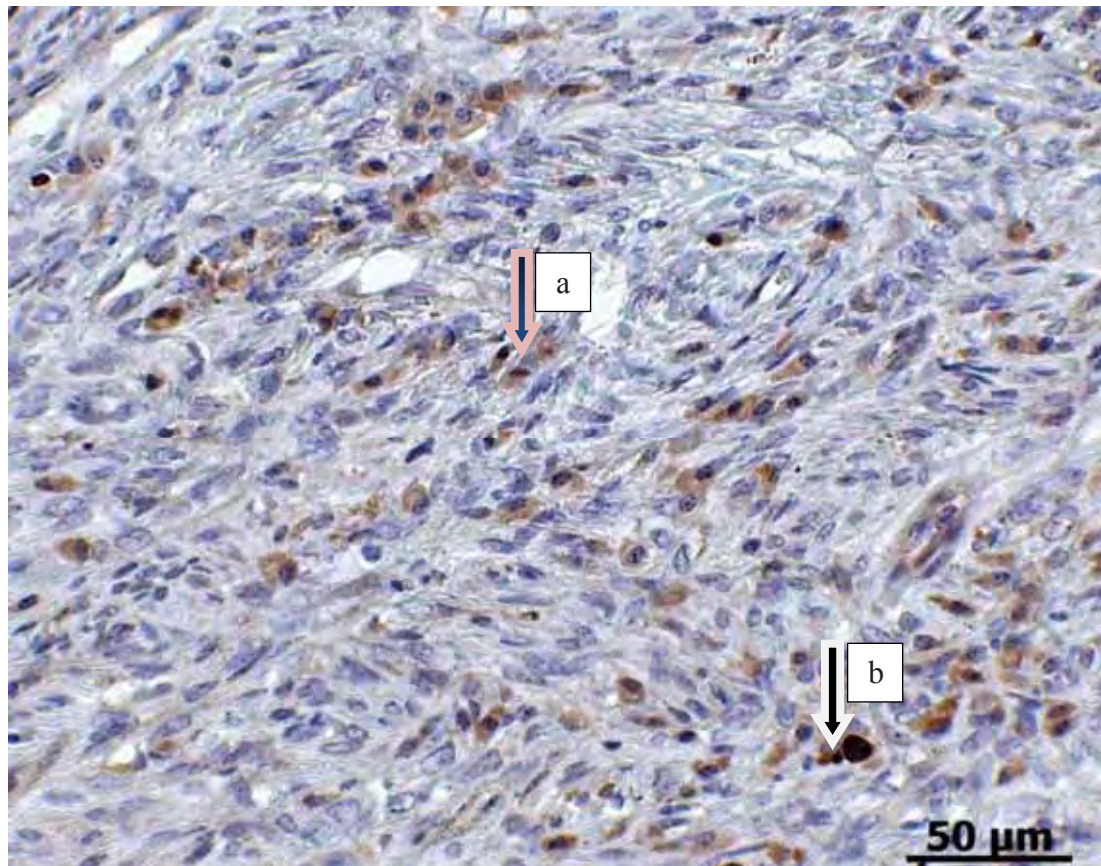


Figura 25. Fotomicrografia mostrando a imuno-marcação para caspase-3. Positividade em fibroblastos de forma difusa (seta a) e puntiforme (seta b). Imuno-histoquímica, Caspase-3, 1:600, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

Mediana   
 Primeiro e terceiro quartil   
 Valores Plausíveis ———  
 Valor extremo ○

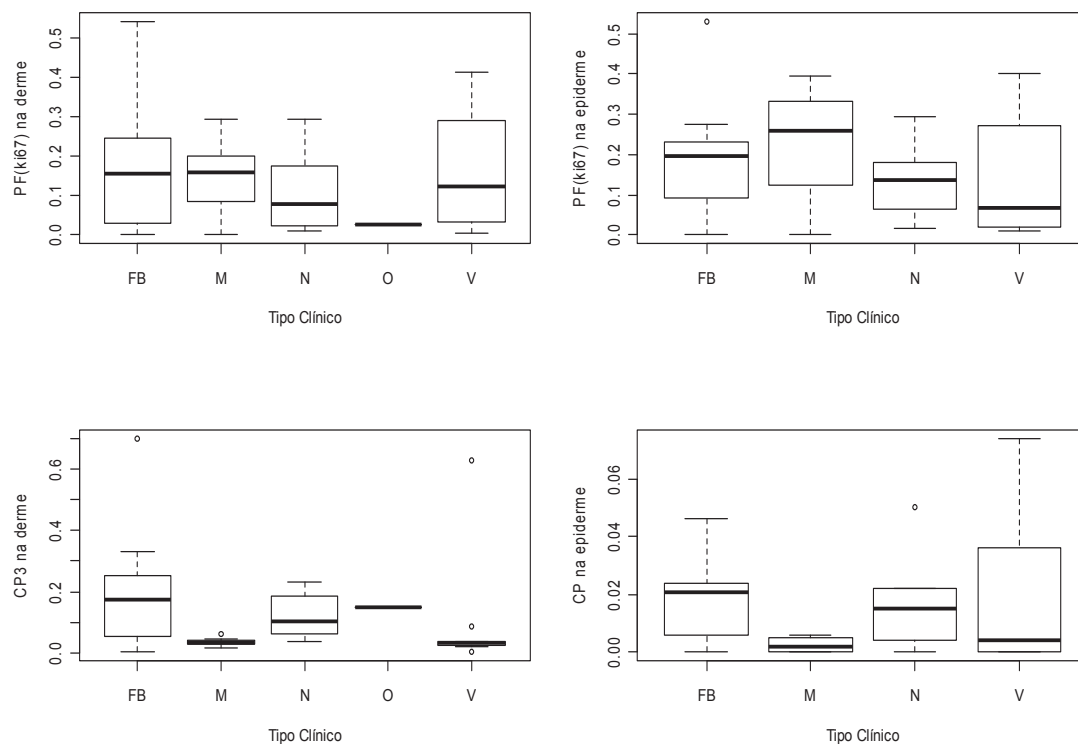


Figura 26. A imuno-marcação da porção proliferativa pelo Ki-67 na derme e na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino. A imuno-marcação da apoptose pela caspase-3 na derme e na epiderme, segundo o tipo clínico de sarcoide equino, sendo FB fibroblástico, M Misto, N Nodular, O Oculto e V Verrucoso.

#### 4.3.4. Expressão da p53

Foram analisadas 41 amostras de sarcoide equino com marcação em 40 casos, destas 36 apresentaram expressão da proteína p53. A expressão nuclear da proteína p53 localizou-se nos núcleos das células em 31 casos de sarcoide equino, a expressão perinuclear esteve presente em 34 casos de sarcoide equino e a expressão citoplasmática da p53 esteve presente em oito casos de sarcoide equino (**Tabela 16**).

Entre os diferentes tipos de sarcoide equino, houve a marcação em 40 casos analisados, sendo consideradas a presença ou ausência de marcação (**Tabela 17**). Embora não tenham sido considerados estatisticamente significativos, houve a maior expressão pelo tipo clínico fibroblástico em 12 casos e pelo tipo verrucoso em sete casos. Em relação à localização da p53 e o fator de recorrência, não houve diferença estatística significativa entre os diferentes tipos clínicos de sarcoide equino.

A marcação mais encontrada foi à expressão perinuclear. A Figura 27 mostra a expressão da p53 no sarcoide equino.

TABELA 16. Número de casos e porcentagem da localização da expressão da p53 no sarcoide equino.

<i>p53</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Ausência	4	10,00
Presença	36	90,0
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>
<i>Loc p53 nuclear</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Ausência	9	22,50
Presença	31	77,50
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>
<i>Loc p53 perinuclear</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Ausência	6	15,00
Presença	34	85,00
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>
<i>Loc p53 citoplasmático</i>	<i>Número de casos</i>	<i>%</i>
Ausência	32	80,00
Presença	8	20,00
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00</b>

TABELA 17. Número de casos e porcentagem da localização da expressão da p53 entre os diferentes tipos de sarcoide equino.

p53 nuclear	Ausência (%)	Presença (%)	Total (%)
Fibroblástico	3 (7,50)	12 (30,00)	15 (37,50)
Misto	2 (5,00)	5 (12,00)	7 (12,50)
Nodular	2 (5,00)	6 (15,00)	8 (20,00)
Oculto	-	1 (2,50)	1 (2,50)
Verrucoso	2 (5,00)	7 (17,50)	9 (22,50)
<b>Total</b>	<b>9 (22,50)</b>	<b>31(77,50)</b>	<b>40 (100,00)</b>
p53 perinuclear	<b>Ausência</b>	<b>Presença</b>	<b>Total</b>
Fibroblástico	3 (7,50)	12 (30,00)	15 (37,50)
Misto	2 (5,00)	5 (12,50)	7 (17,50)
Nodular	2 (5,00)	6 (15,00)	8 (20,00)
Oculto	-	1 (2,50)	1 (2,50)
Verrucoso	2 (5,00)	7 (17,50)	9 (22,50)
<b>Total</b>	<b>9 (22,50)</b>	<b>31 (77,50)</b>	<b>40 (100,00)</b>
p53 citoplasmática	<b>Ausência</b>	<b>Presença</b>	<b>Total</b>
Fibroblástico	12 (30,00)	3 (7,50)	15 (37,50)
Misto	4 (10,00)	3 (7,50)	7 (17,50)
Nodular	8 (20,00)	-	8 (20,00)
Oculto	-	1 (2,50)	1 (2,50)
Verrucoso	8 (20,00)	1 (2,50)	9 (22,50)
<b>Total</b>	<b>32(80,00)</b>	<b>8 (20,00)</b>	<b>40 (100,00)</b>

#### 4.3.4.1. Índice de fator recorrência pela expressão da p53 no sarcoide equino

Para a variável de localização da p53 segundo a recidiva, pelo método de regressão logística, a localização nuclear da p53,  $p=0,003$  e  $p=0,861$ , para a localização perinuclear da p53, com  $p=0,00$  e  $p=0,99$ , e a localização citoplasmática da expressão da p53 no sarcoide equino, sendo  $p=0,00$  e  $p=0,89$ , não se encontrou efeito de fator de recorrência ou recidiva em nenhum dos três casos.

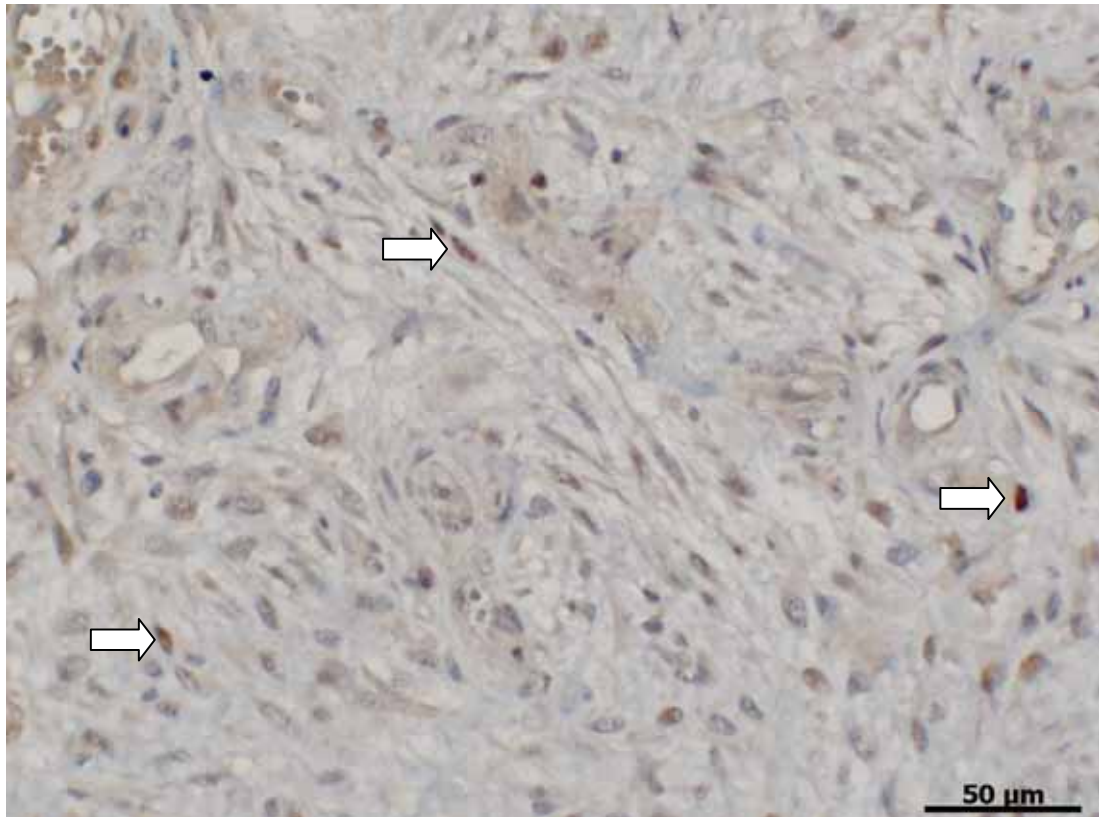


Figura 27. Fotomicrografia mostrando a expressão da p53 perinuclear pelas células neoplásicas do sarcoide equino. Imuno-histoquímica, p53, 1:1600, Novolink, contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

#### 4.4. Correlação de todas as variáveis estudadas neste projeto

Quanto ao número de observações encontradas, encontrou-se correlação positiva entre a idade e o tamanho do sarcoide equino ( $p=0,516$ ), entre a média da área do núcleo da derme com o número de Nors na derme ( $p=0,420$ ) e entre o número de Nors na derme e o número de Nors na epiderme ( $p=0,415$ ), e foi constatado a correlação negativa entre o tamanho das amostras de sarcoide equino e o número de Nors na epiderme do sarcoide equino ( $p= 0,549$ ), e, entre a média das áreas da relação Nors/Núcleo na derme.

## 5. DISCUSSÃO

O sarcoide equino é reconhecido como uma identidade clínica e descrito historicamente desde 1936 (JACKSON, 1936). Embora haja pesquisas abundantes em várias regiões do mundo, no Brasil poucos são os trabalhos de levantamento relacionados a esta neoplasia (RAMOS et al., 2008; BRUM et al., 2010). Neste estudo, as 41 amostras de sarcoide equino foram revisadas do ponto de vista epidemiológico, classificadas clinicamente e descritas morfológicamente. As avaliações microscópicas incluíram a determinação dos achados histológicos, a determinação do índice proliferativo pelos métodos histoquímico (AgNOR) e imuno-histoquímico (expressão de Ki-67), o índice apoptótico das células tumorais pela expressão imuno-histoquímica da caspase-3 e a expressão da p53 em cada tipo clínico do sarcoide equino, procurando sempre correlacionar estes dados com os tipos clínicos encontrados.

A maior parte das amostras de sarcoide equino utilizadas neste projeto foram recuperadas dos arquivos do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp – Campus de Botucatu. O número total de casos que ocorreram no período de 1967 a 2010 foi superior a 41 amostras, porém de muitos dos casos não se conseguiu obter todos os dados necessários para o estudo proposto. A falta de informações sobre a identificação do animal, anamnese e outros dados clínicos, assim como problemas na quantidade e qualidade do material emblocado em parafina, foram as principais dificuldades encontradas. Por causa disto o número de amostras teve de ser reduzido àquelas com as quais teríamos a condição adequada de trabalho. Desta forma, as amostras utilizadas englobaram apenas o período entre 1987 e 2010.

O presente estudo demonstrou que entre os animais portadores de sarcoide equino, excluindo-se os SRD, predominaram àqueles pertencentes às raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês e Mangalarga. A prevalência da raça nos equinos portadores deste tipo de neoplasia é um assunto polêmico, já que as informações existentes na literatura são discrepantes e, muitas vezes conflitantes. Parece não haver predileção por raça segundo alguns autores (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995). Porém as raças apontadas como mais prevalentes pelos nossos dados coincidem com os resultados de outros autores (ANGELOS, 1998; PLUMMER, 2005; VALENTINE, 2006; WOBESER et al., 2010). Nenhum animal da raça Crioula estava entre os equinos utilizados no nosso projeto. Esta raça é apontada como a mais prevalente por dois estudos realizados

no Brasil (RAMOS et al., 2008; BRUM et al., 2010). Na Europa, é relatado o maior acometimento nos animais da raça Wielkopolska (KASPEROWICZ et al., 2006). Deve-se ressaltar que estes resultados, provavelmente, têm relação direta com a composição racial da população equina nas regiões estudadas. Parece que estas discrepâncias quanto à incidência do sarcoide equino estariam relacionadas às condições presentes nos diferentes continentes (BROSTOM, 1995). Outro dado importante que deve ser considerado é o tipo de utilização dos animais. O aparecimento de sarcoides fibroblásticos em locais previamente traumatizados é frequente (KNOTTENBELT, 1995; SCOTT & MILLER Jr., 2003). Assim sendo, equinos mais expostos a lesão mecânica da pele, utilizados em práticas esportivas e na lida, como os das raças Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês e Mangalarga, podem ser mais susceptíveis a este tipo clínico de sarcoide equino, que coincidentemente foi o mais frequente na nossa casuística.

No que diz respeito ao sexo dos animais, os nossos resultados mostraram que houve predomínio dos machos em relação às fêmeas, o que corrobora os resultados de outros autores (MOHAMMED et al., 1992; TORRONTGUI & REID, 1994). Neste aspecto os dados constantes da literatura consultada são também discrepantes. Já foi sugerido que a maior frequência se dá em fêmeas (KASPEROWICZ et al., 2006, BRUM et al., 2010), ou mesmo em animais castrados (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995; ANGELOS, 1998; PLUMMER, 2005). Há ainda os que acreditam não haver predisposição por sexo (KNOTTENBELT, 2005).

Os equinos portadores de sarcoide equino utilizados no presente estudo apresentaram faixa etária ampla indo de animais muito jovens, com menos de um ano, até animais com 15 anos. No entanto, 83% dos animais possuíam menos de dez anos de idade. Na literatura as faixas etárias citadas como as de maior ocorrência desta neoplasia variam um pouco. Assim para a idade são citadas as faixas entre três a sete anos (SCOTT & MILLER Jr., 2003, RAMOS et al. 2008), um a seis anos (KNOTTENBELT, 2009) ou um a cinco anos (BRUM et al., 2010). Deve-se ressaltar que animais com apenas um ano de idade podem apresentar a neoplasia (MARTI et al., 1993; BROSTOM, 1995). Além disso, em áreas de alta prevalência do sarcoide equino, a ocorrência do tumor em cavalos senis não é incomum (SCOTT & MILLER Jr., 2003). No entanto, pode-se afirmar que o sarcoide equino é uma neoplasia que acomete predominantemente animais em uma faixa etária mais ativa, sendo menos frequente em animais senis.

No nosso estudo a pelagem predominante foi a castanha, resultado semelhante ao encontrado por Brostom (1995). Porém diferente dos achados de Kasperowicz et al. (2006), que apontou a pelagem baia como mais frequente em sua casuística. Acredita-se que a ocorrência de um número maior de equinos com uma pelagem específica pode se dever aos genes dominantes que determinam a coloração dos pelos dos equinos em cada raça (KASPEROWICZ et al., 2006). Porém, esta assertiva carece de comprovação.

A localização preferencial das neoplasias na nossa casuística foi na região da cabeça, seguida dos membros e da região peitoral, como relatado por outros autores (KASPEROWICZ et al, 2006). Estudo realizado na Europa cita, além das regiões da cabeça e dos membros, as localizações, abdominal e cervical (BROSTOM, 1995). Os resultados do nosso estudo também são semelhantes aos relatados para a América do Norte, Austrália e África do Sul (RAGLAND et al., 1970). Dados de levantamento realizado no Brasil indicam a região dos membros como a mais acometida (BRUM et al., 2010). Com relação aos diferentes tipos clínicos de sarcoide equino, o tipo fibroblástico foi mais frequente na região da cabeça, seguida da região dos membros. Os tipos clínicos misto, nodular e verrucoso também se apresentaram tendo a cabeça como a localização predominante. Nos membros, houve o predomínio do tipo clínico fibroblástico e verrucoso. Estes dados estão de acordo com os citados por outros autores (KNOTTEBELT, 1995; SCOTT & MILLER Jr., 2003). Assim sendo, as áreas do corpo mais expostas aos traumas, inclusive aqueles relacionados ao uso dos arreios, são aquelas em que a frequência do sarcoide equino é mais expressiva.

Em relação ao tamanho das tumorações, houve o predomínio de amostras maiores de quatro centímetros e de lesões únicas. Na literatura consultada, os tumores únicos de tamanho pequeno ou médio são citados como prevalentes (KASPEROWICZ et al., 2006). No entanto, outros trabalhos indicam uma frequência maior para as lesões múltiplas (TORRONTEGUI & REID, 1994; BRUM et al., 2010). Nossos dados mostram que os tumores múltiplos foram mais frequentes no tipo clínico fibroblástico, não sendo encontrado nas formas mista e nodular, o que demonstra o comportamento mais agressivo de determinados tipos clínicos do sarcoide equino. No nosso estudo, foi constatada a correlação positiva entre o tamanho das neoplasias e a idade dos animais, revelando que os animais mais jovens mostravam geralmente tumores de dimensões maiores.

Dos tipos clínicos de sarcoide equino, o mais frequente entre os animais incluídos neste estudo foi o fibroblástico, que correspondeu a 39,03% das amostras. Os tipos

verrucoso, nodular e misto também estiveram presentes de forma expressiva. Já o tipo oculto foi pouco frequente e apenas o tipo maligno não foi encontrado em nossa casuística. Nossos dados estão de acordo com as observações de diversos autores (SCOTT & MILLER Jr., 2003; BRUM et al., 2010; WOEBSER et al., 2010). Em estudo realizado no Brasil, a forma clínica mais observada foi a fibroblástica, que ocorreu em 42,2% dos tumores diagnosticados, sendo seguido do misto com 31,2%, do verrucoso 17,2%, da forma oculta com 7,8% e da nodular com 1,6% (BRUM et al., 2010). No Brasil, não existe relato sobre a ocorrência da forma clínica maligna. Esta é uma forma clínica que foi descrita há algum tempo (KNOTTENBELT, 1995), e embora tenha sido incluída e considerada por nós entre os tipos clínicos de sarcoide equino, pode não ter recebido a mesma atenção de outros autores nacionais. No Canadá o tipo clínico encontrado com maior frequência foi o fibroblástico em 31% dos casos, seguido do nodular com 22%, sendo que os tipos oculto, verrucoso e misto mostraram cada um frequência próxima de 15%. Já foi sugerido que inicialmente o sarcoide equino se apresenta como um tipo clínico menos agressivo, seja o tipo clínico oculto ou verrucoso e, então, posteriormente transforma-se em uma forma mais agressiva, como a fibroblástica (MARTI et al., 1993; BROSTOM et al., 1995). Da confrontação destes dados pode-se depreender que o tipo clínico fibroblástico é o mais comumente encontrado e que os outros tipos clínicos podem mostrar certa variabilidade. Esta pode ser atribuída à influência exercida por fatores predominantes nas diferentes regiões geográficas (KNOTTENBELT & MATHEWS, 2001). Além disso, deve-se levar em conta que o sarcoide equino é uma neoplasia que mostra evolução de um determinado tipo clínico para outro, sendo variável o estágio em que a neoplasia se encontra no momento do diagnóstico, representando uma neoplasia com comportamento progressivo. No nosso trabalho, não pode ser estabelecida qualquer relação entre a presença de processos inflamatórios e o aparecimento do tumor, embora a habronemose tenha sido diagnosticada em amostras de sarcoide equino da nossa casuística.

Os critérios morfológicos microscópicos considerados no sarcoide equino são descritos por diversos autores (MARTENS et al., 2000; SCOTT & MILLER JR., 2003; KASPEROWICZ et al., 2006). Nossos achados na porção dérmica do tumor corroboram os relatos destes autores. Assim sendo, embora a microscopia não seja definidora de um tipo clínico de sarcoide equino, pode ser considerada para a exclusão de alguns destes tipos. A morfologia da epiderme talvez possa ser utilizada para a diferenciação entre os tipos clínicos fibroblástico e nodular, e fibroblástico e verrucoso.

Kasperowicz et al., (2006) utilizaram o método de AgNOR para avaliação do índice proliferativo no sarcoide equino e constataram que os tipos clínicos fibroblásticos mostraram número de AgNORs por núcleo superior aos tipos oculto e misto. Nossos resultados não mostraram diferença significativa no que diz respeito a este parâmetro e também no que diz respeito à área de NORs entre os tipos clínicos. No entanto, foi encontrada correlação positiva entre o número de NORs na derme e o número de NORs na epiderme, demonstrando que os componentes epidérmicos e dérmicos da neoplasia proliferam simultaneamente.

A marcação imuno-histoquímica pelo Ki-67 para avaliar o índice proliferativo dos sarcoides equinos foi utilizada por poucos autores (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005; BOGAERT et al., 2007). Quando avaliadas em separado, as regiões mais superficiais dos tipos verrucoso e fibroblástico mostram atividade proliferativa significativamente mais alta, se comparadas aos tipos oculto e nodular (MARTENS et al., 2000; BOGAERT et al., 2007). No nosso trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa quanto a este parâmetro, porém a marcação coincide com os tipos clínicos mais proliferativos, o nodular e fibroblástico mais proliferativo na derme, e o fibroblástico e misto na epiderme. Geralmente, a porção mesenquimal das lesões relacionadas ao sarcoide equino não está associada a altos níveis proliferativos, mostrando índices semelhantes aos encontrados na pele normal (NIXON et al., 2005). Estes achados sustentam as observações prévias, inclusive clínicas, de que o sarcoide equino pode permanecer quiescente durante anos (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005).

Além dos marcadores de proliferação celular, outro índice relacionado com o comportamento biológico das neoplasias é a apoptose (PHILIPS et al., 2000). Ainda são poucos os dados na literatura veterinária sobre a utilização da marcação pela caspase-3 para a determinação do índice apoptótico, principalmente na espécie equina. Além disso, não existem dados sobre a determinação imuno-histoquímica da expressão de caspase-3 no sarcoide equino. Já que estas lesões parecem não estar associadas a altos índices proliferativos, é natural que se suspeite que o acúmulo de células tumorais seja consequência também de alterações nos mecanismos de apoptose. No nosso trabalho, o maior índice apoptótico do componente dérmico do tumor foi encontrado nos sarcoides do tipo clínico fibroblástico, seguidos dos nodulares, dos mistos e dos verrucosos. Foi constatada a diferença estatisticamente significativa quanto a este parâmetro entre o tipo clínico fibroblástico e os tipos clínicos, misto e verrucoso. Da mesma forma, o tipo

clínico nodular mostrou também índices apoptóticos superiores ao tipo verrucoso. No que diz respeito à epiderme não houve diferença entre os tipos clínicos. Estes dados podem ser utilizados como mais uma ferramenta para a diferenciação microscópica dos tipos clínicos de sarcoide, porém o seu significado como fator de prognóstico da neoplasia necessita de estudos mais aprofundados.

As mutações no gene p53 não têm papel importante na patogênese do sarcoide equino (BUCHER et al., 1996). Este achado foi corroborado por investigações posteriores em asininos (NASIR et al., 1999). Entretanto, foi demonstrado que 44% das lesões de sarcoide em equinos mostravam localização aberrante perinuclear da proteína p53, sugerindo que a sua inativação não teria origem mutacional, mas a perda da função ocorreria provavelmente devido a localização anormal da proteína (BUCHER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1996; MARTENS et al., 2000), resultando na perturbação do ciclo celular e do equilíbrio entre a proliferação e morte celular, devido a anormalidades das vias de apoptose (NIXON et al., 2005). Neste trabalho, a maior frequência de imuno-marcação para p53 apresentou-se na forma perinuclear corroborando os achados de trabalhos anteriores (MARTENS et al., 2000; NIXON et al., 2005).

O sequestro citoplasmático da proteína p53 como um mecanismo alternativo de inativação funcional foi primeiramente descrito por Moll et al. (1992), em uma variante do carcinoma da mama, e os autores propuseram a inativação da função do p53 pela exclusão nuclear. O acúmulo da proteína p53 e sua compartimentalização já foram descritos em numerosos tumores, incluindo os neuroblastomas indiferenciados (MOLL et al., 1995), carcinomas coloretoriais (BASARI et al., 1995) e carcinoma do ovário (RUNNEBAUM et al., 1996), e é frequentemente associada com a presença da p53 do tipo selvagem (MOLL et al., 1992, 1995; BASARI et al., 1995). As investigações preliminares do acúmulo perinuclear da p53 selvagem em sarcoides equinos (JOHNSTON et al., 1996; NASIR et al., 1999), implicam na exclusão nuclear.

O status de outros genes supressores tumorais no sarcoide equino precisa ser estabelecido. No entanto, já se tem conhecimento de que os genes indutores de apoptose têm sua função reduzida nas linhagens celulares e nas células tumorais do sarcoide equino (YUAN et al., 2008). O marcador p53 pode ser um importante parâmetro a ser usado com bons resultados como fator prognóstico (KASPEROWICZ et al., 2006), no que diz respeito a resposta a terapia (MARTENS et al., 2000) e na investigação da correlação da marcação positiva em cavalos acometidos pelo sarcoide equino e com predisposição a recorrência (KASPEROWICZ et al., 2006). No presente trabalho, não

pudemos associar a expressão da p53 com a recidiva, devido ao pequeno número de amostras de casos recorrentes.

O presente trabalho teve como um dos objetivos comparar as características dos diferentes tipos clínicos de sarcoide equino, com o intuito de estabelecer os achados predominantes em cada um deles. Estes dados obtidos podem ser correlacionados não só com as características morfológicas, mas também fornecer informações e sobre o comportamento biológico da neoplasia.

## 6. CONCLUSÕES

Não há diferença na taxa de proliferação celular epidérmica ou dérmica entre os diferentes tipos clínicos de sarcoide equino.

O índice apoptótico é mais elevado nos tipos clínicos fibroblástico e nodular, e menor no tipo clínico verrucoso. Este dado pode ser utilizado como mais uma ferramenta para a diferenciação microscópica dos tipos clínicos de sarcoide.

A expressão da p53 mostrou-se predominantemente perinuclear, independentemente do tipo clínico de sarcoide. Esta localização pode indicar a inativação funcional desta proteína.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. *Manual de Imuno-histoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999, p. 270.
- ANGELOS, J.A.; MARTI, E; LAZARY, S.; CARMICHAEL, L.E. Characterisation of BPV-like DNA in equine sarcoids. *Arq. of Virol.*, v.1-2, p.95-109, 1991.
- ANGELOS, J.A. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Anim. Genet.*, v.19, p.417, 1998.
- BASARI, S., VIALE, G., RONCALLI, M. et al. P53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalisation in colorectal adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.*, v. 147, p. 790–798, 1995.
- BOGAERT, L.; POUCKE, M.V.; DeBAERE, C.; DEWULF, J.; PEELMAN, L.; DUCATELLE, R.; GASTHUYS, F.; MARTENS, A. Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *J. Gen. Virol.*, v.88, p.2155-2161, 2007.
- BROSTOM, H. Equine sarcoids. A clinical and epidemiological study in relation to equine leucocyte antigens (ELA). *Acta. Vet. Scand.*, v.36, p. 223, 1995.
- BRUM, J.S.; SOUZA, T.M.; BARROS, C.S.L. Aspectos epidemiológicos e distribuição anatômica das diferentes formas de clínicas do sarcoide equino no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30(10), p. 839-843, 2010.
- BUCHER, K.; SALAI, G.; MARTI, E.; GRIOT-WENK, M.E.; LAZARY, S. Tumour suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. *Vet. Sci.*, v.61, p.114-119, 1996.
- CAMPO, M.S.; Papillomavirus and diseases in humans and animals. *Vet. Comp. Onc.*, v. 1, p.3-14, 2003.
- CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.A.; O'BRIEN, P.M.; REID, S.W.J.; LOVE, S.; CAMPO, M.S.; NASIR, L. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J. Gen. Virol.*, v.84, p.1055-1062, 2003.
- CHEN, T.; WONG, Y.S. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygenspecies generation. *Inter. J. Biochem. Cell. B.*, 2008 (in press)
- CROCKER, J.; PARAMJIT, N.A.R. Nucleolar Organizer regions in Lymphomas. *J. Pathol.* v.151, p.111-118, 1987.
- DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Review Intern. Exp. Pathol.* v. 32, p. 149-192, 1991.
- DONOGHUE, S.; BADEN, H.S.; LAUDER, I.; SOBOLEWSKI, S.; PRINGLE J.H. Immunohistochemical localization of Caspase-3 correlates with clinical outcome in B-Cell Diffuse Large-Cell Lymphoma. *Can. Res.* v.59, p.5386-5391, 1999.
- DUKERS, D.F.; OUDEJANS, J.J.; VOS, W.; BERGE, R.L.; MEIJER, C.J.L.M. Apoptosis in B-cell lymphomas and restive lymphoid tissues always involves activation of caspase-3 as determined by a new in situ detection method. *J. Pathol.* v. 196, p.307-315, 2002.
- FINLAY, M.; YUAN, Z.Q.; BURDEN, F.; TRAWFORD, A.; MORGAN, I.M.; CAMPO, M.S.; NASIR, L. The detection of Bovine Papillomaviruses type 1 DNA in flies. *Virus Res.*, v. 144, p. 315-317, 2009.

GERDES, J.; LI, L.; SCHLUETER, C.; DUCHROW, M.; WOHLBERG, C.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANT, E.; FLAD, H.D. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen is defined by mononuclear antibody ki-67. *Am. J. Pathol.*, v. 138, p.867-873, 1991.

GINN, P.E.; MANSELL, J.E.K.; RAKICH, P.M. in JUBB, KENNEDY AND PALMER'S. *Pathology of Domestic Animals*. 5.ed. Boston: Saunders, 2007. p. 763-764.

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. in MEUTEN, D.J. *Tumors in Domestic Animals*. 4.ed. Iowa State Press, 2002. p. 88-89.

GRIFFEY, S.M.; KRAEGEL, S.A; MADEWELL, B.R. Proliferation indices in spontaneous canine lung cancer: proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), ki-67 (MIB-1) and Mitotics counts. *J. Comp. Pathol.* v.120, p.321-332, 1999.

HAUPT S, BERGER M, GOLDBERG Z, HAUPT Y. Apoptosis—the p53 network. *J. Cell. Sci.* v. 116, p.4077–85, 2003.

HOFSETH, L.J.; HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* v. 25, p.177–81, 2004.

JACKSON, C. The mixed tumours. Onderstepoort. *J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, p. 345-385, 1936.

JOHNSTON, H. M.; THOMPSON, H.; PIRIE, H. M. P53 immunohistochemistry in domestic animal tumours. *Eur. J. Vet. Pathol.* v. 2(3), p. 135–140, 1996.

KASPEROWICZ, B.; ROTKIEWICZ, T.; OTROCKA-DOMAGALA, I. Pathomorphological and immunohistochemical study of selected markers of tumour cell proliferation in equine sarcoids. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.9(2), p. 109-119, 2006.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Vet. Pathol.*, v. 36, p.292-300, 1999.

KNOTTENBELT, D.C. Diagnosis and treatment of the equine sarcoid. *Practice*, v.17, p.224, 1995.

KNOTTENBELT, D.C. MATHEWS, J.B. A positive step forwards in the diagnosis of equine sarcoid. *Vet J*, v.161, p.224, 2001.

KNOTTENBELT, D.C. A Suggested Clinical Classification for the Equine Sarcoid. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v.4, p.278-295, 2005.

LAVACH, J. D.; SULLINS, K. E.; ROBERTS, S. M.; SEVERIN, G. A., WHEELER, C.; LUEKER, D. C. BCG treatment of periocular sarcoid. *Equine Vet. J.* v. 17, p. 445-8, 1985.

LAZARY, S.; GERBER, H.; GLATT, P.A.; STRAUB, R. Equine leukocyte antigens in sarcoid-affected horses. *Equine Vet. J.*, v. 17, p. 283-286, 1985.

LEVINE, A.J.; CHANG, A.; DITTMER, D. The p53 tumor suppressor gene. *J. Lab. Clin. Med.*, v.123, p.817-823, 1994.

LUNA, L.G. *Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology*. Washington:McGraw Hill, 1968, p.258.

MARCHETTI, B.; GAULT, E.A.; CORTESE, M.S.; YUAN, Z.Q.; ELLIS, S.A.; NASIR, L.; CAMPO, M.S. Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. *J. Gen. Virol.*, v. 90, p. 2865-2870, 2009.

MARTENS, A; DE MOOR, A.; DEMEULEMEESTER, J.; DUCATELLE, R. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Vet. Sci.*, v.69, p.295-300, 2000.

- MARTENS, A.; DE MOOR, A.; DEMEULEMEESTER, J.; PEELMAN, L. Polymerase chain reaction analysis of the surgical for bovine papilloma virus DNA. *Vet. Surg.*, v. 30(5), p. 460-467, 2001
- MARTI, E.; LAZARY, S.; ANTCZAR, D.F.; GERBER, H. Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine Vet. J.*, v.25, p.397-407, 1993.
- McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4.ed. St Louis: Mosby, 2007. p.161.
- MEREDITH, D.; ELSER, A.H.; WOLF, B.; SOMA, L.R.; DONAWICK, W.J.; LAZARY, S. Equine leukocyte Antigens; Relationships with Sarcoid Tumors and Laminitis in two Pure Breeds. *Immunog.*, v.23, p.221-225, 1986.
- MOHAMMED, H.O.; REBHUN, W.C.; ANTCZACK, D.F. Factors associates with the risk of developing sarcoid tumours in horses . *Equine Vet. J.*, v.24, p. 165-168, 1992.
- MOLL, U. M., RIOU, G. & LEVINE, A. J. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 7262–6, 1992.
- MOLL, U. M., LAQUAGLIA, M., BENARD, J. & RIOU, G. Wildtype p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumours. *P. Natl. Acad. Sci. (USA)* 92, 4407–11, 1995.
- MUNDAY, J.S.; KIUPEL, M. Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia im mammals. *Vet Pathol.*, v.47, p.254-264, 2010.
- NASIR, L.; McFARLANE, S.T.; TORRONTGUEI, B.O.; REID, S.W.J. Screening for papillomavirus in peripheral blood cells of donkeys with and without sarcoids. *Vet. Sci.*, v.63, p.289-290, 1997.
- NASIR, L.; MCFARLANE, S.T.; REID, S.W.J. Mutational Status of the Tumour Suppressor Gene (P53) in Donkey Sarcoid Tumours. *Vet. J.*, v.157, p.99-101, 1999.
- NIXON, C.; CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.; SAVERIA CAMPO, M.; BURR, P.; ARGYLE, D.J.; REID, S.W.J.; NASIR, L. Expression of cell cycle associated proteins cyclin A, CDK-2, p27 and p53 in equine sarcoids. *Cancer Lett.*, v.221, p.237-245, 2005.
- PHILLIPS, B.S.; KASS, P.H.; NAYDAN, D.K.; WINTHROP, M.D.; GRIFFEY, S.M.; MADEWELL, B.R. Apoptotic and proliferation indexes in canine lymphoma. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.12, n.2, p.111-117, 2000.
- PLUMMER, C.E. Equine Eyelid Disease. *Clin. Tech. Equine Pract.*, v.4, p. 95-105, 2005.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P. et al. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer region at the optical level. *Histoch. J.*, v. 18, p. 5-14, 1986.
- RAGLAND, W.L.; McLAUGHLIN, C.; SPENCER, G.R. Equine Sarcoid. *Equine Vet. J.*, v.2, p.2-11, 1970.
- RAMOS, A.T.; DE SOUZA, A.B; NORTE, D.M.; FERREIRA, J.LM.; FERNANDES, C.G. Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. *Cienc. Rural*, v.38, n.1, p.148-154, 2008.
- REID, S.W.J.; SMITH, K.T.; JARRET, W.F. Detectation, cloning and characterisation of the papillomaviral DNA present in sarcoid tumours of Equus Asinus. *Vet. Rec.*, v.135, p. 430-432, 1994.
- REIJERKERK, E.P.R.; VELDHUIS KROEZE, E.J.B.; SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M.M. Equine sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.*, v.26, p.20-26, 2009.

- ROBERT, M.; FRIEDLANDER, M.D. Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases. *N. Engl. J. Med.*, v.348, p.1365-1375, 2003.
- ROELS, S.S.; TILMANT, R.; DUCATELLE, R. PCNA and KI-67 Proliferation Markers as Criteria for Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs. *J. Comp. Pathol.* v.121, p.13-24, 1999.
- RUNNEBAUM, I. B., KIEBACK, D. G., MOBUS, V. J. & KREINBERG, R. Subcellular localisation of accumulated p53 in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.*, v. 61, p. 266–271, 1996.
- SCHMIDT, N.W.; MAYO, L.D.; DONNER, D.B.; KAPLAN, M.H. p53 regulates Btk-dependent B cell proliferation but not differentiation. *J. of Leuk. Biol.* v. 79, p. 852-859, 2006.
- SCOTT, D.W; MILLER Jr, W.H. *Equine Dermatology*. St louis: Saunders, 2003. p.717-731.
- SLOTA, E.; WNUK, M.; BUGNO, M.; PIENKOWSKA-SCHELLING, A.; SCHELLING, C.; BRATUS, A. & KOTYLAK, Z.. The mechanisms determining the nucleolar-organizing regions inactivation of domestic horse chromosomes. *J. Anim. Breed. Genet.* v.124, p.163–171, 2007.
- SOUSSI, T.; LEGROS, YY.; LUBIN, R.; ORY, K.; SCHLICHTHOLZ, B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *I. J. Cancer.*, v.248, p.1-9, 1994.
- TARWID, J.N.; FRETZ, P.B.; CLARK, E.G. Equine sarcoids: a study with emphasis on pathologic diagnosis. *Comp. Cont. Educ.*, v. 7, p. 293–300, 1985.
- TEIFKE, J.P.; HARDT, M.; WEISS, E. Detection of bovine papillomavirus DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded equine sarcoids by polymerase chain reaction and non-radioactive in situ hybridization. *E. J. Vet. Pathol.*, v. 1, p. 5–10, 1994.
- TORRONTGUEI, B.O.; REID, S.W. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet. Educ.*, v.6, p.85-88, 1994.
- VALENTINE, B.A. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.18, p.123-126, 2006.
- WOBESER, B.K.; DAVIES, J.L.; HILL, J.E.; JACKSON, M.L.; KIDNEY, A.B.; MAYER, M.N.; TOWNSEND, H.G.G.; ALLEN, A.L. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. *Can. Vet. J.*, v. 51, p. 1103-1108, 2010.
- YUAN, Z.Q., GALLAGHER, A., GAULT, E. A., CAMPO, M. S., NASIR, L. Bovine Papillomavirus Infection in Equine Sarcoids and in Bovine Bladder Cancers. *Vet. J.* v.174, p. 599–604, 2007.
- YUAN, Z.Q.; GAULT, E.A.; GOBEIL, P.; NIXON, C.; CAMPO, L.; NASIR, L. Establishment and characterization of equine fibroblast cell lines transformed in vivo and in vitro by BPV-1: Model systems for equine sarcoids. *Viol.*, v.373, p. 352-361, 2008.
- YUAN, Z.Q.; GOBEIL, P.A.M.; CAMPO, M.S.; NASIR, L. Equine sarcoid fibroblasts over-express matrix metalloproteinases and are invasive. *Viol.*, v. 396, p.143–151, 2010.