

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE MARGENS CIRÚRGICAS DE NEOPLASMA  
DE PELE QUIMICAMENTE INDUZIDO EM RATOS (*Rattus  
norvegicus albinus wistar*)**

**Gabriel João Unger Carra**

Médico Veterinário

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DE MARGENS CIRÚRGICAS DE NEOPLASMA  
DE PELE QUIMICAMENTE INDUZIDO EM RATOS (*Rattus  
norvegicus albinus wistar*)**

**Discente: Gabriel João Unger Carra**

**Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

**Coorientadora: Profa. Dra. Josiane Moraes Pazzini**

**Coorientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**2022**

C312a

Carra, Gabriel João Unger

Avaliação de margens cirúrgicas de neoplasma de pele quimicamente induzido em ratos (*Rattus norvegicus albinus wistar*) / Gabriel João Unger

Carra. -- Jaboticabal, 2022

38 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrigo Barboza De Nardi

Coorientadora: Josiane Morais Pazzini

Coorientadora: Paola Castro Moraes

1. Cirurgia veterinária. 2. Oncologia. 3. Neoplasias. 4. Plasma rico em plaquetas. 5. Carcinoma de células escamosas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DE MARGENS CIRÚRGICAS DE NEOPLASMA DE PELE QUIMICAMENTE INDUZIDO EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus wistar*)

**AUTOR: GABRIEL JOÃO UNGER CARRA**

**ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**

**COORDINADORA: PAOLA CASTRO MORAES**

**COORDINADORA: JOSIANE MORAIS PAZZINI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Dra. JOSIANE MORAIS PAZZINI (Participação Virtual)  
Universidade dos Grandes Lagos -UNILAGO / São José do Rio Preto/SP

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Dra. Josiane Moraes Pazzini.

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA (Participação Virtual)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa.

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO FONSECA ALVES (Participação Virtual)  
Depto. de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal / FMVZ - UNESP

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves.

Jaboticabal, 02 de março de 2022

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Gabriel João Unger Carra, nascido no município de Tabatinga, estado de São Paulo, aos trinta dias do mês de setembro de 1993. Formou como Técnico de Informática pelo Colégio Técnico Industrial - CTI/UNESP Bauru em 2011. Ingressou no curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - FMVA/UNESP em 2012, onde foi membro suplente do Conselho do Departamento de Produção e Saúde Animal, membro titular da Congregação e obteve o título de Bacharel em Medicina Veterinária em dezembro de 2017. Entre os anos 2018 e 2020, participou do Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública, com ênfase em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais, no Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, onde foi membro titular do Conselho Deliberativo do Hospital Veterinário, membro titular do conselho do Programa de Aprimoramento Profissional e presidente da Associação dos Médicos Veterinários Residentes. Ingressou em março de 2020 como aluno regular no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/UNESP, nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi e coorientação das Profas. Dras. Josiane Moraes Pazzini e Paola Castro Moraes, onde foi membro titular e suplente do Conselho Deliberativo do Hospital Veterinário.

## EPÍGRAFE

*“Devemos acreditar que somos talentosos em alguma coisa, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.”*

- Marie Curie

## DEDICATÓRIA

Esta, que é a terceira grande redação científica da minha carreira, também é dedicada aos meus pais, irmão e avós: minha família, base e inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Mais dois anos se passaram, e aqui estou redigindo uma nova página de agradecimentos. Volto a dizer que esta não é uma tarefa fácil. Não por não saber agradecer, pois me considero grato a todos que de alguma forma contribuem na minha jornada, mas por tentar diferenciar aqueles que merecem o destaque. Dessa forma, agradeço inicialmente a todos que compartilharam de seu precioso tempo comigo, pois mesmo uma pequena palavra de conforto pode ser o necessário para nos erguer em momentos difíceis. E, sem mais delongas, me permito fazer alguns destaques:

À esta Universidade, que me acolhe desde 2009, seus funcionários e professores, por todo o aprendizado, carinho e oportunidades que tem me fornecido.

Ao meu orientador, professor Andriago Barboza De Nardi, por me acolher como orientado desde o estágio curricular, espero poder acompanhá-lo por ainda muito tempo.

À professora, coorientadora e tão estimada amiga, Josiane Moraes Pazzini. Eu tenho até dificuldades em escrever o quanto sou grato a você por tudo que compartilha comigo: sua amizade, carinho, conhecimentos e experiência de vida.

À professora Paola Castro Moraes, que aceitou me coorientar nessa jornada, com quem aprendo diariamente a arte de exercer essa profissão com carinho e destreza.

À professora Maricy Apparicio Ferreira, por quem agradeço ao universo por ter sido colocada no meu caminho e emprestar um ombro amigo em um momento de lamúria. Sem este momento, a execução deste trabalho teria sido bastante penosa.

Ao professor Carlos Eduardo Fonseca Alves, por me acolher no Laboratório de Imuno-histoquímica da FMVZ/UNESP, e me auxiliar em um momento tão crítico.

Aos professores, residentes e pós-graduandos da Patologia Veterinária da FMVZ/UNESP, em especial ao Felipe César da Silva Brasileiro, que me recebeu com tanto carinho e cuja amizade, antes inesperada, se tornou inestimável.

À equipe de pós-graduandos do Serviço de Oncologia Veterinária da FCAV/UNESP, por compartilharem seus conhecimentos, experiências e risadas comigo. Me considero um profissional melhor por tudo que aprendo com vocês.

Aos meus colegas de pós-graduação, e amigos, Ariadne, Gabriel, Gustavo, Marcella e Marcelo, por me lembrarem que as vezes a vida não deve ser levada tão a sério, e por dividirem um pouquinho de suas vidas comigo.

Ao Guilherme Henrique Rodrigues Braz, que se tornou parte da minha jornada e tem aturado e me guiado nos tropeções da carreira acadêmica e da vida. Esta com certeza é mais leve ao seu lado.

À minha família: meu irmão, cunhada e avós, por entenderem que os momentos longe são parte dessa difícil jornada, mas que os raros momentos em companhia são sempre prazerosos e me permitem lembrar que a vida as vezes é doce.

E por fim, mas não menos importante, aos meus pais, Maria Helena Unger e Wilson Carra. Apoiar o sonho de uma carreira acadêmica em um país que não valoriza esta não é tarefa fácil.

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

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                     | Página    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>                                                                                                                                                     | <b>ii</b> |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                                                                                                                                                                                   | <b>v</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                                                                                                                                                        | <b>vi</b> |
| <b>CAPÍTULO 1. Considerações Gerais .....</b>                                                                                                                                                                       | <b>1</b>  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                                 | 1         |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                                                                                                      | 3         |
| 2.1. Carcinoma espinocelular .....                                                                                                                                                                                  | 3         |
| 2.2. Margens de segurança.....                                                                                                                                                                                      | 5         |
| 2.3. Plasma rico em plaquetas .....                                                                                                                                                                                 | 7         |
| 2.4. Avaliação tecidual e caracterização do comportamento tumoral.....                                                                                                                                              | 7         |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                                                                                                                                                  | 9         |
| 4. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                                | 10        |
| <b>CAPÍTULO 2. Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica de margens cirúrgicas de neoplasma de pele quimicamente induzido em ratos: estudo da interação do plasma rico em plaquetas com o leito tumoral .....</b> | <b>14</b> |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                                 | 15        |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                         | 16        |
| 2.1. Obtenção do material .....                                                                                                                                                                                     | 16        |
| 2.2. Avaliação histológica e gradação de atipia celular .....                                                                                                                                                       | 18        |
| 2.3. Expressão de fibras colágenas por picrosirius vermelho.....                                                                                                                                                    | 19        |
| 2.4. Contagem de densidade microvascular por CD31 .....                                                                                                                                                             | 19        |
| 2.5. Análise estatística.....                                                                                                                                                                                       | 20        |
| 3. RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                                 | 21        |
| 3.1. Avaliação histológica e gradação de atipia celular .....                                                                                                                                                       | 21        |
| 3.2. Contagem microvascular .....                                                                                                                                                                                   | 23        |
| 3.3. Expressão de colágenos tipo I e tipo III .....                                                                                                                                                                 | 25        |
| 4. DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                                                  | 27        |
| 4.1. Avaliação histológica e gradação de atipia celular .....                                                                                                                                                       | 27        |
| 4.2. Contagem microvascular .....                                                                                                                                                                                   | 28        |
| 4.3. Expressão de colágenos tipo I e tipo III.....                                                                                                                                                                  | 29        |
| 5. CONCLUSÃO .....                                                                                                                                                                                                  | 31        |
| 6. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                                                                                                | 32        |
| <b>APÊNDICE.....</b>                                                                                                                                                                                                | <b>36</b> |
| APÊNDICE A .....                                                                                                                                                                                                    | 37        |

## CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Projeto intitulado **"Enxerto cutâneo associado ao plasma rico em plaquetas na correção de lesões extensas decorrente da ressecção de neoplasia de pele quimicamente induzidas em ratos (*Rattus norvegicus albinus* Wistar)"**, protocolo nº 008102/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado "Ad-referendum" pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP.

|                     |                                                                                  |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Vigência do Projeto | 01/09/2017 a 31/03/2019                                                          |
| Espécie / Linhagem  | Rato, <i>Rattus norvegicus albinus</i> Wistar                                    |
| Nº de animais       | 30 ratos                                                                         |
| Peso / Idade        | 30g                                                                              |
| Sexo                | Machos                                                                           |
| Origem              | Biotério Central da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Botucatu |

Jaboticabal, 20 de junho de 2017.

  
**Prof. Dr. Lizandra Amoroso**  
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil  
 tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

**AVALIAÇÃO DE MARGENS CIRÚRGICAS DE NEOPLASMA DE PELE  
QUIMICAMENTE INDUZIDO EM RATOS (*Rattus norvegicus albinus wistar*)**

**RESUMO** – O carcinoma espinocelular (CEC) é caracterizado pela proliferação maligna de queratinócitos epidérmicos. A cirurgia é a principal conduta terapêutica em lesões passíveis de ressecção em cães e gatos, sendo preconizada a confecção de margens amplas de segurança. Devido à esse fator, muitas vezes é necessária a confecção de grandes defeitos cirúrgicos e o emprego de técnicas que aceleram a reparação tecidual é sugerida. Dentre estas técnicas, o emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) é bastante aceito com o objetivo de acelerar a reparação tecidual. Sugere-se, entretanto, que o estímulo angiogênico em leito cirúrgico de lesões neoplásicas pode levar à recidiva local. Assim, observa-se a necessidade de avaliar outros critérios que acompanham o desenvolvimento tumoral, a fim de desenvolver uma metodologia mais fidedigna na investigação das margens de segurança. O presente estudo objetivou avaliar se a aplicação de PRP em leito cirúrgico após a exérese tumoral de neoplasma quimicamente induzido em ratos pode influenciar a recidiva neoplásica, formação de novos vasos e alteração da expressão de fibras colágenas. Concluiu-se que, aos moldes de neoplasmas de pele quimicamente induzidos, as margens cirúrgicas de 5mm são insuficientes para evitar a recidiva de lesões tumorais, bem como a avaliação histológica para visualização de células tumorais em bordos cirúrgicos é um critério insuficiente para detectar alterações teciduais pré-neoplásicas e pode acarretar no comprometimento da eficácia terapêutica. Concluiu-se ainda que a contagem de densidade microvascular (CDMV) e gradação de atipia celular são fatores correlatos e podem indicar alterações teciduais que antecedem a formação neoplásica.

**Palavras-chave:** angiogênese, carcinoma espinocelular, leito tumoral, margens de segurança, oncologia veterinária, plasma rico em plaquetas

## SURGICAL MARGINS EVALUATION OF CHEMICALLY INDUCED SKIN NEOPLASM IN RATS (*Rattus norvegicus albinus wistar*)

**ABSTRACT** – Squamous cell carcinoma (SCC) is characterized by the malignant proliferation of epidermal keratinocytes. Surgery is the main therapeutic approach in lesions that can be resected in dogs and cats, and wide safety margins are recommended. Due to this factor, it is often necessary to make large surgical defects and the use of techniques that accelerate tissue repair is suggested. Among these techniques, the use of platelet-rich plasma (PRP) is widely accepted with the aim of accelerating tissue repair. It is suggested, however, that the angiogenic stimulus in the surgical bed of neoplastic lesions can lead to local recurrence. Thus, there is a need to evaluate other criteria that accompany tumor development, in order to develop a more reliable methodology in the investigation of safety margins. The present study aimed to evaluate whether the application of PRP in the surgical bed after tumor excision of chemically induced neoplasm in rats can influence neoplastic recurrence, formation of new vessels and alteration of collagen fiber expression. It was concluded that, for chemically induced skin neoplasms, surgical margins of 5mm are insufficient to prevent recurrence of tumor lesions, as well as histological evaluation for visualization of tumor cells in surgical edges is an insufficient criterion to detect pre-neoplastic tissue alterations and may compromise the therapeutic efficacy. It was also concluded that the microvascular density count (MVDC) and grading of cell atypia are correlated factors and may indicate tissue alterations that precede neoplastic formation.

**Keywords:** angiogenesis, platelet-rich plasma, safety margins, squamous cell carcinoma, tumor bed, veterinary oncology

## LISTA DE ABREVIATURAS

|       |                                       |
|-------|---------------------------------------|
| CEC:  | carcinoma espinocelular               |
| cm:   | centímetro                            |
| CDMV: | contagem de densidade microvascular   |
| DMBA: | 7,12-dimetilbenzantraceno             |
| DAB:  | 3,3'-diaminobenzina tetrahidrocloreto |
| GC:   | grupo controle                        |
| GT:   | grupo tratamento                      |
| LT:   | leito tumoral                         |
| MD:   | margem distante                       |
| MP:   | margem próxima                        |
| PRP:  | plasma rico em plaquetas              |
| TPA:  | 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato   |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1. Considerações Gerais .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>Figura 1.</b> Imagem representativa da técnica cirúrgica micrográfica de Mohs. que busca a remoção do neoplasma visível em camadas, avaliando a margem histológica no transoperatório. Fonte: National Cancer Institute, 2010.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 4         |
| <b>CAPÍTULO 2. Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica de margens cirúrgicas de neoplasma de pele quimicamente induzido em ratos: estudo da interação do plasma rico em plaquetas com o leito tumoral .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>14</b> |
| <b>Figura 1.</b> Representação gráfica da metodologia de indução tumoral e separação dos animais em grupos controle (GC) e tratamento (GT). LT = leito tumoral, MP = margem próxima, MD = margem distante, PRP = plasma rico em plaquetas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2018.....                                                                                                                                                                                                                  | 17        |
| <b>Figura 2.</b> Imagem fotográfica ilustrando a orientação das amostras colhidas de ratos, nos quais foi induzido quimicamente lesão neoplásica de pele. LT = leito tumoral, MP = margem próxima, MD = margem distante. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2018.....                                                                                                                                                                                                                                    | 18        |
| <b>Figura 3.</b> Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Demonstração de critérios de atipia celular, segundo Bánozci et al. (1976). <b>A)</b> (GC) Displasia anexial. Folículos pilosos de diferentes tamanhos (setas). Observe o folículo aberrante, à direita. HE. 10x. <b>B)</b> Ampliação de 40x da Imagem A. Notar anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular intrafolicular (estrelas). Nucléolos evidentes (seta). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/UNESP Botucatu/SP, 2022..... | 21        |
| <b>Figura 4.</b> Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Demonstração de critérios de atipia celular, segundo Bánozci et al. (1976). <b>A)</b> (GC) Visualização geral de pele e anexos. Presença de artefatos em conjunto à tecido adiposo não corado. Notar displasia anexial com aumento do número de folículos com diferentes tamanhos destes. Espessamento epidérmico. HE, 4x. <b>B)</b> (GT) Espessamento epidérmico. Perda de estratificação parietal. Anisocitose e                                      |           |

anisocariose (estrelas). Hiperchromatismo nuclear em diferentes camadas (setas). HE, 40x. **C)** (GC) Espessamento epidérmico focal, com desorganização das camadas e formação de pérola córnea primitiva (seta). HE, 40x. **D)** (GT) Notar crosta hemática com infiltrado inflamatório neutrofílico, hora hipersegmentados, hora degenerados. Presença de hiperqueratinização (estrela), pérolas córneas primitivas (setas), anisocariose, anisocitose e nucléolos evidentes (cruzes). HE, 40x. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/UNESP Botucatu/SP, 2022. ....22

**Figura 5.** Representação gráfica da análise quantitativa do grau de atipia celular nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a região MD e as regiões MP e LT. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....23

**Figura 6.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Imunomarcção com CD31 e contra-coloração com hematoxilina para contagem de densidade microvascular (CDMV). Aumento de 40x. **A)** Região com baixa densidade microvascular. **B)** Região com alta densidade microvascular. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....24

**Figura 7.** Representação gráfica da análise quantitativa do número médio de vasos nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a região MD e as regiões MP e LT. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....24

**Figura 8.** Representação gráfica da correlação observada ( $p < 0,05$ ) entre o número médio de vasos contados e o grau de atipia celular nos grupos Tratado (T) e Controle (C). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....25

**Figura 9.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo I nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....25

- Figura 10.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo III nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....26
- Figura 11.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo I **(A)** e tipo III **(B)** nos grupos Tratado e Controle. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....26
- Figura 12.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Luz polarizada, coloração histoquímica de picrosirius vermelho. **A)** Região com alta expressão de fibras colágenas tipo III (verde). **B)** Região alta expressão de fibras colágenas tipo I (vermelho). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021. ....30

## CAPÍTULO 1. Considerações Gerais

### 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é caracterizado pela proliferação maligna de queratinócitos epidérmicos, podendo ser classificado como *in situ* ou invasivo de acordo com a apresentação clínica (Fernandez-Figueiras et al., 2015; Schmitz et al., 2019). A cirurgia é a principal conduta terapêutica em lesões passíveis de ressecção em cães e gatos, sendo preconizada a confecção de margens amplas de segurança devido ao comportamento invasivo do CEC (Kopke et al., 2005, Moncrieff et al., 2015; Stratigos et al., 2020b).

Devido à necessidade da ressecção cirúrgica com margens amplas, muitas vezes é necessária a confecção de grandes defeitos cirúrgicos e associação de técnicas reconstrutivas extensas (Pazzini et al., 2017), que podem gerar grande morbidade. Dessa forma, o emprego de técnicas que aceleram a reparação tecidual é bastante discutida. Dentre estas técnicas, o emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) é bastante aceito com o objetivo de acelerar a reparação tecidual devido ao efeito de estimulação da angiogênese apresentado. Sugere-se, entretanto, que o estímulo angiogênico em leito cirúrgico de lesões neoplásicas pode levar à recidiva local de neoplasmas que não foram removidos em sua totalidade (Spartalis, 2017; Pazzini et al., 2021).

A ressecção com margens de segurança incompletas, onde células tumorais permanecem no paciente, compromete a efetividade terapêutica da cirurgia, predispondo à recidiva tumoral (Amar et al., 2005; Spyropoulou et al., 2020). Dessa forma, a avaliação histológica das margens de segurança, onde procura-se verificar a presença de células tumorais em bordos da lesão, em tumores de caráter infiltrativo como o CEC pode não ser a técnica mais adequada (Kopke et al., 2005). Assim, observa-se a necessidade de avaliar outros critérios que acompanham o desenvolvimento tumoral, como a densidade microvascular e a expressão de fibras de colágeno, fatores bastante difundidos no estudo do comportamento tumoral

(Bedoya et al., 2016; Pazzini et al., 2021), para desenvolver uma metodologia mais fidedigna na investigação das margens de segurança.

Com isso, o presente estudo objetivou avaliar se a aplicação de PRP em leito cirúrgico após a exérese tumoral de neoplasma quimicamente induzido em ratos pode influenciar a recidiva neoplásica, formação de novos vasos e alteração da expressão de fibras colágenas, em regiões de leito tumoral (LT), margem próxima à lesão (MP) e margem distante da lesão (MD).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Carcinoma espinocelular

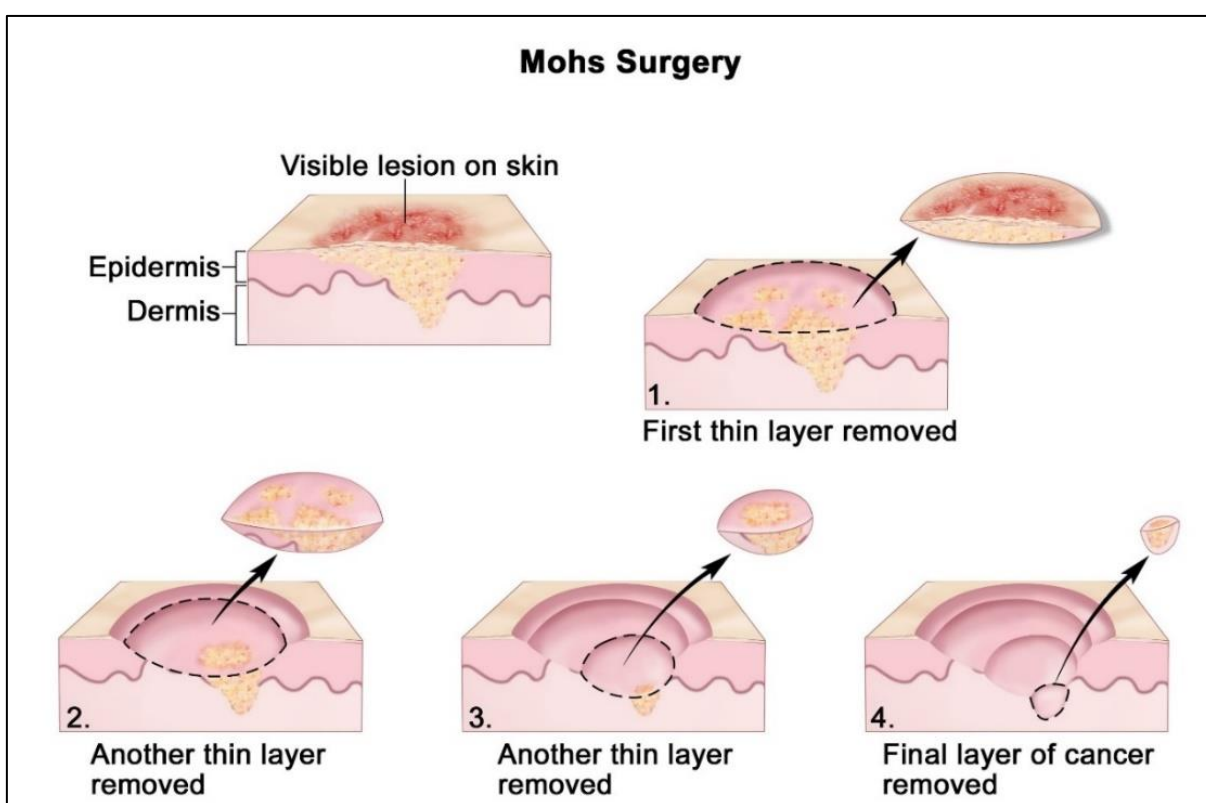
O CEC é caracterizado pela proliferação maligna de queratinócitos epidérmicos, podendo ser classificado como *in situ* ou invasivo de acordo com nível de invasão. Sua origem está relacionada com lesões crônicas de displasia epidérmica e dermatite actínica (Fernandez-Figueiras et al., 2015; Schmitz et al., 2019), mais comumente causadas por exposição prolongada à radiação ultravioleta e agentes químicos carcinogênicos como o alcatrão (Howell e Ramsey, 2021).

É comum o surgimento de lesões e alterações no tecido que precedem a malignidade, com a perpetuação inflamatória do ambiente lesional, chamadas lesões potencialmente malignas caso haja presença de displasia epitelial (Prado et al., 2010), as quais podem permanecer estáveis antes de evoluir, ou não, para um neoplasma. Isso se deve à carcinogênese do CEC, que consiste em um processo de múltiplas etapas, no qual as células vão adquirindo gradativamente as características de malignidade, por meio de diversas alterações genéticas progressivas e cumulativas, que distanciam a célula neoplásica de sua matriz saudável (Tedardi et al., 2016). Há estudos que sugerem que o tecido distante do neoplasma também pode sofrer mutações genéticas e se tornar alvo para recidiva e metástase (Nylander et al., 2002), além do possível comprometimento das margens cirúrgicas em virtude destas mesmas mutações, ainda que não apresentem no determinado momento da avaliação características neoplásicas.

É observado que o CEC tem comportamentos diferentes entre cães e gatos (Meleo, 1997; Pinello et al, 2022), onde os cães tem maior apresentação em região de tórax, membros pélvicos e áreas não específicas/extensas, enquanto em gatos a maior prevalência é em região de face e orelhas, de forma semelhante à como ocorre em humanos (Stratigos et al., 2020a).

A conduta cirúrgica é a primeira opção terapêutica em neoplasmas de pele ressecáveis em humanos, seguido da radioterapia como terapia adjuvante ou primária em casos selecionados, principalmente em região de face, de forma a evitar cirurgias mutilantes (Veness e Howle, 2016). Há duas técnicas principais de ressecção para os

CECs: através da ressecção com margens amplas ou pela técnica menos invasiva de Mohs, na qual se busca retirar o neoplasma em camadas, avaliando-as por histopatologia rápida no tempo transoperatório, retirando uma nova camada caso ainda haja lesão (Figura 1). Esta técnica eleva consideravelmente o tempo cirúrgico e pode ter resultados falso-negativos (Moncrieff et al., 2015; Stratigos et al., 2020b). Bernstein e colaboradores (2012) relataram a utilização da técnica de Mohs na exérese de um neoplasma cutâneo em região de rima palpebral em cão, reconhecendo e validando a técnica, pontuando, entretanto, as limitações existentes para aplicação na veterinária, principalmente devido à necessidade de anestesia geral, a longa curva de aprendizado e a necessidade de equipamentos de custo elevado, tornando-a pouco exequível na rotina da cirurgia oncológica veterinária. Ainda assim, após a ressecção cirúrgica, o CEC pode ter recidiva e/ou metástase local ou à distância, devido ao seu caráter invasivo e metastático (Kamstock et al., 2020a).



**Figura 1.** Imagem representativa da técnica cirúrgica micrográfica de Mohs, que busca a remoção do neoplasma visível em camadas, avaliando a margem histológica no transoperatório. Fonte: National Cancer Institute, 2010.

Dessa forma, a cirurgia com margens de segurança adequadas é de extrema importância para evitar que células neoplásicas permaneçam no leito cirúrgico após a exérese tumoral, bem como para evitar a submissão do paciente a uma nova intervenção para correção das margens comprometidas ou, até mesmo, para a retirada de nova lesão, uma vez que células residuais são potenciais fontes de crescimento de novos focos tumorais, geralmente de caráter mais agressivo que o neoplasma original (Amar et al., 2005; Spyropoulou et al., 2020).

## **2.2. Margens de segurança**

Em oncologia, a margem cirúrgica macroscópica é caracterizada por uma porção de tecido aparentemente normal, definida pelo cirurgião, ao redor das bordas do neoplasma a ser excisado, sendo normalmente preconizado 3 cm para lesões malignas e 1 cm para lesões benignas (Kamstock et al., 2020). Em neoplasmas cujas células formam blocos bem definidos, geralmente de carácter expansivo, o limite entre o neoplasma e o tecido saudável pode ser bem delimitado. Já em casos em que o neoplasma apresenta arquitetura infiltrativa, suas células se espalham pelo tecido perilesional de forma difusa, tornando o reconhecimento das bordas bastante difícil (Kopke et al., 2005). Dessa forma, para delimitar de forma precisa e saber se houve comprometimento das margens cirúrgicas, é necessário o estudo da margem microscópica, definida pelo patologista. Este realizará a avaliação do material encaminhado por meio de cortes histológicos para identificação de células neoplásicas entre a área do tecido acometido e o tecido ao redor, tidas como saudáveis pelo cirurgião, de forma a classificar o comprometimento das margens microscópicas (Rapini, 1990).

Em humanos, assim como em gatos, devido à maior incidência de CEC ocorrer em cabeça e pescoço (Meleo, 1997; Stratigos et al., 2021a; Pinello et al., 2022) procedimentos menos invasivos, não mutiladores e com menos alterações cosméticas, como a técnica de Mohs, a radioterapia, a criocirurgia, a eletroquimioterapia ou uma abordagem multimodal são indicados. Da mesma forma, estas técnicas são recomendadas nos casos de recidiva nos quais uma segunda ressecção pode causar grande perda de qualidade de vida (Stratigos et al., 2020a,

Howell e Ramsey, 2021). Em cães, por outro lado, as regiões de maior acometimento são os membros, tórax e áreas despigmentadas e de pouca incidência de pelos, e devido à menor necessidade de manutenção estética do paciente, a técnica mais comumente empregada é a ressecção de margens amplas (Meleo, 1997; Łojczyk et al., 2021; Pinello et al., 2022).

Em CECs *in situ*, é recomendado pela diretriz da Associação Britânica de Dermatologia, margens de quatro a seis milímetros (Motley et al., 2003), enquanto para CECs invasivos ainda não há recomendações definidas para margens de segurança quando a avaliação histopatológica transoperatória não está disponível (Stratigos et al., 2020b).

A recidiva tumoral está altamente relacionada à ressecção cirúrgica com margens comprometidas, existindo também outros fatores como o tamanho do tumor, a região, profundidade da lesão, nível de invasão local, tipo histológico e imunossupressão do paciente (Rowe et al., 1992). Segundo Spyropoulou e colaboradores (2020), a avaliação de amostras de CECs que foram removidos com comprometimento de margem tiveram menor diferenciação celular, e Vasconcelos e colaboradores (2014) reportaram em um estudo retrospectivo com 100 pacientes que a recidiva de CECs pode ocorrer até 3 anos após a ressecção do neoplasma primário. Como o CEC favorece o desenvolvimento de metástase linfática proximal assim como infiltração em terminações nervosas locais (Cherpelis et al., 2002; Huang et al., 2004; Vasconcelos et al., 2014; Spyropoulou et al., 2020), é de suma importância a realização de uma avaliação precisa das margens microscópicas e o correto manejo precoce em casos de ressecção incompleta do neoplasma.

Devido a isso, a avaliação histológica das margens cirúrgicas através da pesquisa de células neoplásicas nos bordos da peça cirúrgica em tumores de caráter infiltrativo como o CEC pode não ser a técnica mais adequada (Kopke et al., 2005). Dessa forma, observa-se a necessidade de avaliar outros critérios que permitam também o estudo do comportamento do tecido adjacente ao tumor, como a avaliação da densidade microvascular e da expressão de fibras de colágeno, capazes de nos ajudar a compreender de forma mais eficaz o comportamento tumoral e a real higidez do tecido perilesional (Bedoya et al., 2016; Pazzini et al., 2021), e assim desenvolver uma metodologia mais eficaz na investigação das margens cirúrgicas.

### **2.3. Plasma rico em plaquetas**

O plasma rico em plaquetas um produto obtido do sangue do próprio paciente. É caracterizado por ser um produto concentrado de plaquetas que leva em sua composição fatores de crescimento e citocinas (Vendramin et al., 2010; Pazzini et al., 2017; Badran et al., 2018), com capacidade de auxiliar na reparação tecidual e acelerar o fechamento de feridas cirúrgicas.

Dentre os diversos mecanismos nos quais a aplicação do PRP interfere, destacam-se a ativação e liberação de alfa-grânulos plaquetários que contém fator de crescimento plaquetário, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento transformador beta, interleucina-1 (Kim et al., 2011; Abuaf et al., 2016; Badran et al., 2018), substâncias atuantes no processo de reparação, remodelamento e cicatrização tecidual, capazes de estimular a angiogênese e colagenização local.

### **2.4. Avaliação tecidual e caracterização do comportamento tumoral**

Ratos têm sido utilizados como modelo de estudo para carcinogênese de neoplasmas de pele há décadas, através do administração de carcinogênicos como o 7,12 dimetilbenzantraceno e a exposição prolongada à radiação ultravioleta B, permitido a investigação de eventos biológicos, genéticos e fatores determinantes que afetam o processo de carcinogênese, assim como a avaliação da natureza do câncer, sua forma progressão, capacidade metastática e o papel da inflamação e da angiogênese na perpetuação tumoral (Loriè et al., 2018). Para a caraterização de lesões e investigação de recidiva em CECs, os critérios propostos por Bánoczy et al. (1976) são utilizados há décadas por diversos autores como um método objetivo (Mainenti e Rosa, 2008; Masa et al., 2013; Pazzini et al., 2021).

A contagem de densidade microvascular (CDMV) tem sido amplamente utilizada no estudo da progressão tumoral por diversos autores, uma vez que esta aparenta estar associada à progressão tumoral devido à intensa angiogênese estimulada pelo microambiente tumoral, de forma a alcançar os níveis de oxigênio necessários para a perpetuação das células neoplásicas (Kampoli et al., 2022). O uso de marcadores endoteliais como o CD31 são utilizados para a marcação de vasos

sanguíneos e linfáticos no estudo da CDMV (Maeda et al., 1995; Ilan e Madri, 2003; Marinho, 2003; Teófilo, 2012; Pazzini et al., 2017).

O estudo da expressão de colágeno em neoplasmas tem sido estudado como fator comportamental e preditivo na sobrevida e risco de metástase de diversos tipos de câncer (Rosen et al., 2020; Garcia et al., 2021; Morkunas et al., 2021). Dentre as possíveis marcações para avaliação da expressão de fibras colágenas e seus subtipos, a utilização de Picrosirius Vermelho e sua leitura por microscopia de luz polarizada vem sendo utilizada há décadas como uma metodologia válida, de baixo custo e fácil execução (Bedoya et al., 2016; Rittié, 2017; Lima et al., 2020; Moreira, et al., 2020), permitindo a visualização, quantificação e estratificação entre fibras de tipo I e III. A avaliação das fibras colágenas e seu nível de deposição podem ser relacionados ao comportamento tumoral (Samal et al., 2012; Bedoya et al., 2016; Rosen et al., 2020), uma vez que uma maior deposição de fibras colágenas tipo I é observada em tumores malignos, em comparação à maior deposição de fibras colágenas tipo III observada e tumores benignos.

### **3. OBJETIVOS**

O presente estudo objetivou avaliar se a aplicação de PRP em leito cirúrgico após a exérese tumoral de neoplasma quimicamente induzido em ratos pode influenciar a recidiva neoplásica, formação de novos vasos e alteração da expressão de fibras colágenas, em regiões de leito tumoral (LT), margem próxima à lesão (MP) e margem distante da lesão (MD), de forma a estabelecer parâmetros de avaliação que complementem a avaliação histológica padrão para margens cirúrgicas de CECs.

#### 4. REFERÊNCIAS

- Abuaf OK, Yildiz H, Baloglu H, et al. (2016) Histologic evidence of new collagen formulation using platelet rich plasma in skin rejuvenation: a prospective controlled clinical study. **Annals of Dermatology**. 28: 718-724.
- Amar A, Curioni OA, Franzi AS, Rapoport A (2005) Recidivas locais após tratamento cirúrgico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágio avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**. 32:60-63.
- Bánózi J, Csiba A (1976) Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. **Oral Surgery**. 42:766-774.
- Bedoya SAO, Conceição LG, Vilorio MIV, et al. (2016) Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 68:147-154.
- Bernstein JA, Storey ES, Bauer RW (2012) Moh's micrographic surgery for the management of a periocular mast cell tumor in a dog. **Veterinary Ophthalmology**. 16:234-239.
- Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG (2002) Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma. **Dermatology Surgery**. 28:268-273.
- Fernandez-Figueiras MT, Carrato C, Saenz X, et al. (2015) Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**. 29:991-997.
- Garcia APV, Reis LA, Nunes FC, et al. (2021) Canine mammary cancer tumour behavior and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**. 11:1-13.
- Howel JY, Ramsey ML (2021) Squamous Cell Skin Cancer. **StatPearls Publishing** [internet]. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441939/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441939/)
- Huang CC, Boyce SM (2004) Surgical Margins of Excision for Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**. 23:167-173.
- Ilan N, Madri, JA (2003) PECAM-1: old friend, new partners. **Current Opinion in Cell Biology**. 15:515-524.
- Instituto Nacional de Câncer - INCA (2021) Detecção Precoce do Câncer. **Ministério da Saúde**. Rio de Janeiro.

Kamstock DA, Russell DS, Powers EP (2020) The Pathology of Neoplasia. In.: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (Eds.) **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Estados Unidos, p. 61-80.

Kim DH, Je YJ, Kim CD, et al. (2011) Can platelet-rich plasma be used for skin rejuvenation? Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human dermal fibroblast. **Annals of Dermatology**. 23:424-431.

Kopke LFF, Andrade Filho JS (2005) Margem de segurança: um conceito antigo e relativo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80:279-286.

Lima IC, Wu SV, Silva LM, et al. (2020) Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 11:1-8.

Łojarczyk A, Łopuszyński W, Szadkowski M, et al. (2021) Aggressive squamous cell carcinoma of the cranium of a dog. **BMC Veterinary Research**. 17:1-8.

Loriè EP, Stark HJ, Berning M, Boukamp P (2018) Skin squamous cell carcinoma models: The role in combating the disease. **Skin Tissue Models**. p. 151-173.

Maeda S, Chung YS, Takatsuka S, et al. (1995) Tumor angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicator in gastric carcinoma. **British Journal of Cancer**. 72:319-323.

Mainenti P, Rosa, LEB (2008) Carcinogênese Química Experimental em Glândulas Salivares - Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 24:167-174.

Marinho ER (2003) **Avaliação imunohistoquímica da densidade microvascular em adenocarcinoma gástrico**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Masa APP, Severo MLB, Carmo ED, et al. (2013) Vascularização e grau de atipia epitelial em lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas. **Revista Pesquisa em Saúde**. 14:27-30.

Meleo KA (1997) Tumors of the Skin and Associated Structures. **Radiation Oncology**. 27:73-94.

Moncrieff MD, Shah AK, Igali L, Garioch JJ (2015) False negative rate of intraoperative frozen section margin analysis for complex head and neck nonmelanoma skin cancer excisions. **Clinical Experimental Dermatology**. 40:834:838.

Moreira SH, Pazzini JM, Álvarez JLG, et al. (2020) Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). **Lasers in Medical Science**. 1:1-7.

Motley R, Kersey P, Lawrence C (2003) Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. **British Journal of Plastic Surgery**. 56:85-91.

Morkunas M, Zilenaite D, Laurinaviciene A, et al. (2021) Tumor collagen framework from bright-field histology images predicts overall survival of breast carcinoma patients. **Scientific Reports**. 11:1-13.

Nylander K et al. (2002) Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. **Journal of Pathology**. 198:417-427.

Pazzini JM, Serafim EL, Gärtner F, et al. (2017) Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37:1519-1525.

Pazzini JM, Moreira SM, Cassino P, et al. (2021) Skin graft associated with platelet-rich plasma in correcting extensive injuries resulting from the resection of skin cancer chemically induced in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 36:1-9.

Pinello L, Pires I, Castro AF, et al. (2022) Cross Species Analysis and Comparison of Tumors in Dogs and Cats, by Age, Sex, Topography and Main Morphologies. Data from Vet-OncoNet. **Veterinary Sciences**. 9:1-18.

Prado SM, Cedrún JL, Rey RL, et al. (2010) Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. **Experimental Molecular Pathology**. 89:197-203.

Rapini RP (1990) Comparison of methods for checking surgical margins. **Journal of American Academic Dermatology**. 23:288-294.

Rittié L (2017) Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. In.: Rittié L (Eds.) **Fibrosis. Methods in Molecular Biology**. Estados Unidos, p. 395-407.

Rosen S, Brisson BK, Durham AC, et al. (2020) Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. **PLoS One**. 15:1-22.

Rowe DE, Carroll RJ, Day CL (1992) Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 26:976-990.

Samal ME, Vila RE, Asis OG, et al. (2012). Identificación de colágeno I y III com picrosirius red / polarización em el estroma de tumores salivares. **International Journal of Odontostomatology**. 6:59-64.

Schmitz L, Gambichler T, Kost C, et al. (2019) Cutaneous squamous cell carcinomas are associated with basal proliferating actinic keratoses. **British Journal of Dermatology**. 180:916-921.

Spartalis E, Tsilimigras DI, Charalampoudis P, et al. (2017) The “Yin and Yang” of Platelet-rich Plasma in Breast Reconstruction After Mastectomy or Lumpectomy for Breast Cancer. **Anticancer Research**. 37:6557-6562.

Spyropoulou FA, Pavlidis L, Trakatelli M, et al. (2020) Cutaneous squamous cell carcinoma with incomplete margins demonstrate higher tumour grade on re-excision. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. 34:1478-1481.

Stratigos AJ, Garbe C, Dessinioti C, et al. (2020a) European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 1. epidemiology, diagnostics and prevention. **European Journal of Cancer**. 128:60-82.

Stratigos AJ, Garbe C, Dessinioti C, et al. (2020b) European interdisciplinary guideline on invasive squamous cell carcinoma of the skin: Part 2. Treatment. **European Journal of Cancer**. 128:83-102.

Tedardi MV, Kimura KC, Mendonça PP, Dagli MLZ (2016) Epidemiologia e etiologia do câncer. In.: Daleck CR, De Nardi AB (Eds.) **Oncologia em cães e gatos**. p.2-28.

Teófilo, CR (2012) **Expressão de CD31, CD34 e triptase em lesões potencialmente malignas e nos carcinomas de células escamosas orais**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Vasconcelos L, Melo JC, Miot HA, et al. (2014) Invasive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: clinical and histopathological characteristics, frequency of local recurrence and metastasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 89:562-568.

Vendramin FS, Franco D, Franco TR (2010) Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. 25:589-594.

Veness MJ, Howle J (2016) Cutaneous Carcinoma. In.: Gunderson LL, Tepper JE (Eds.) **Clinical Radiation Oncology**. United States p. 763-776.

## **CAPÍTULO 2. Avaliação histoquímica e imuno-histoquímica de margens cirúrgicas de neoplasma de pele quimicamente induzido em ratos: estudo da interação do plasma rico em plaquetas com o leito tumoral**

Gabriel João Unger Carra<sup>1\*</sup>, Felipe César da Silva Brasileiro<sup>2</sup>, Paola Castro Moraes<sup>1</sup>, Carlos Eduardo Fonseca Alves<sup>3</sup>, Josiane Moraes Pazzini<sup>4</sup>, Andriago Barboza De Nardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV, UNESP, Jaboticabal, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, Brasil

<sup>4</sup> União das Faculdades dos Grandes Lagos, UNILAGO, São José do Rio Preto, Brasil

\* Autor correspondente. Endereço de e-mail: gjucarra@outlook.com

**Resumo:** O carcinoma espinocelular (CEC) é caracterizado pela proliferação maligna de queratinócitos epidérmicos. A cirurgia é a principal conduta terapêutica em lesões passíveis de ressecção em cães e gatos, sendo preconizada a confecção de margens amplas de segurança. Devido à esse fator, muitas vezes é necessária a confecção de grandes defeitos cirúrgicos e o emprego de técnicas que aceleram a reparação tecidual é sugerida. Dentre estas técnicas, o emprego do plasma rico em plaquetas (PRP) é bastante aceito com o objetivo de acelerar a reparação tecidual. Sugere-se, entretanto, que o estímulo angiogênico em leito cirúrgico de lesões neoplásicas pode levar à recidiva local. Assim, observa-se a necessidade de avaliar outros critérios que acompanham o desenvolvimento tumoral, a fim de desenvolver uma metodologia mais fidedigna na investigação das margens de segurança. O presente estudo objetivou avaliar se a aplicação de PRP em leito cirúrgico após a exérese tumoral de neoplasma quimicamente induzido em ratos pode influenciar a recidiva neoplásica, formação de novos vasos e alteração da expressão de fibras colágenas. Concluiu-se que, aos moldes de neoplasmas de pele quimicamente induzidos, as margens cirúrgicas de 5mm são insuficientes para evitar a recidiva de lesões tumorais, bem como a avaliação histológica para visualização de células tumorais em bordos cirúrgicos é um critério insuficiente para detectar alterações teciduais pré-neoplásicas e pode acarretar no comprometimento da eficácia terapêutica. Concluiu-se ainda que a contagem de densidade microvascular (CDMV) e gradação de atipia celular são fatores correlatos e podem indicar alterações teciduais que antecedem a formação neoplásica.

**Palavras-chave:** angiogênese, carcinoma espinocelular, leito tumoral, margens de segurança, oncologia veterinária, plasma rico em plaquetas

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele cães e gatos, a casuística de CEC representa cerca de 5% de todos os tumores de pele (Łojarczyk et al., 2021). Este é caracterizado pela proliferação maligna de queratinócitos epidérmicos. Sua origem está relacionada a lesões de displasia epidérmica e dermatite actínica (Fernandez-Figueiras et al., 2015; Schmitz et al., 2019), causadas geralmente por exposição prolongada à radiação ultravioleta, agentes carcinogênicos como o alcatrão (Howell e Ramsey, 2021) e perpetuação da resposta inflamatória local à diversos estímulos (Prado et al., 2010).

De acordo com a apresentação e comportamento clínico, pode ser classificado como *in situ* ou invasivo. A principal conduta terapêutica em cães e gatos é a exérese de lesões passíveis de ressecção com margens cirúrgicas amplas, porém devido à maior ocorrência de lesões, principalmente em gatos, em região de cabeça e pescoço, o comprometimento das margens de segurança ocorre na tentativa de manter uma boa qualidade de vida para o animal (Meleo, 1997; Pinello et al., 2022).

A ressecção com margens de segurança comprometidas, onde células tumorais permanecem no paciente, interfere na efetividade terapêutica da cirurgia, predispondo à recidiva tumoral (Amar et al., 2005; Spyropoulou et al., 2020). Dessa forma, a avaliação histológica das margens de segurança, onde procura-se verificar a presença de células tumorais em bordos da lesão, em tumores de caráter infiltrativo como o CEC pode não ser a técnica mais adequada (Kopke et al., 2005). Assim, observa-se a necessidade de avaliar outros critérios que acompanham o desenvolvimento tumoral, como a densidade microvascular e a expressão de fibras de colágeno, fatores de avaliação capazes de predizer o comportamento tumoral (Maeda et al., 1995; Bedoya et al., 2016; Pazzini et al., 2021).

Quando é possível a ressecção cirúrgica com margens amplas, a confecção de grandes defeitos leva à necessidade de técnicas reconstrutivas extensas, e o emprego de substâncias que auxiliam na reparação tecidual como o PRP (Vendramin, 2014; Pazzini et al., 2017). Sugere-se, entretanto, que o estímulo angiogênico em leito cirúrgico de lesões neoplásicas pode levar à recidiva local de neoplasmas que não foram removidos em sua totalidade (Spartalis, 2017; Pazzini et al., 2021).

Com isso, o presente estudo objetivou avaliar se a aplicação de PRP em leito cirúrgico após a exérese tumoral de neoplasma quimicamente induzido em ratos pode influenciar a recidiva neoplásica, formação de novos vasos e alteração da expressão de fibras colágenas, em regiões de leito tumoral (LT), margem próxima à lesão (MP) e margem distante da lesão (MD).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

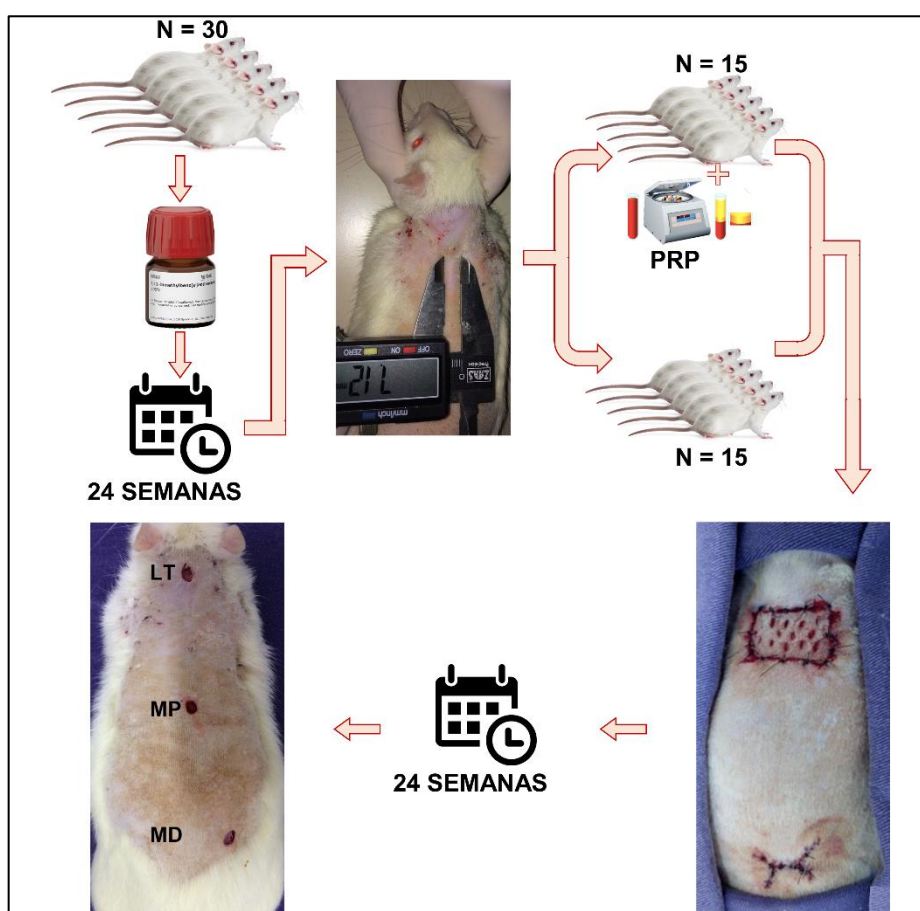
### **2.1. Obtenção do material**

A indução da carcinogênese, o procedimento cirúrgico, bem como as análises de recidiva são parte integrante da proposta inicial da pesquisa experimental do projeto de pós-doutorado (protocolo CEUA Nº 008102/17 / Nº Processo FAPESP 2016/24658-3), no qual o objetivo do estudo foi avaliar se o uso de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) no local do enxerto após a ressecção de um neoplasma quimicamente induzido pode influenciar uma recidiva devido às propriedades do PRP em estimular a angiogênese, mitogênese e quimiotaxia.

Foi realizada a indução da carcinogênese na pele da região dorsal do tórax, 3 cm no sentido caudal à primeira vértebra cervical, por meio da aplicação intradérmica de DMBA (7,12-dimetilbenzantraceno, Merck KGaA - Darmstadt - Alemanha) à 0,5% diluído em acetona, conforme descrito por Oliveira e colaboradores (2015). Os ratos foram avaliados diariamente por um período de 24 semanas.

Ao final da 24ª semana, todos os animais apresentaram lesão macroscópica em região de aplicação do DMBA e fez-se a ressecção cirúrgica do neoplasma seguindo 5mm de margem ao redor da lesão macroscópica. Os animais então foram separados em dois grupos, com 15 animais cada, sendo que no primeiro grupo (Controle - GC), não foi aplicado o PRP, apenas confeccionado o enxerto cutâneo em malha, enquanto no segundo grupo (Tratamento - GT) após a ressecção tumoral foi aplicado PRP no leito receptor do enxerto cutâneo em malha e procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica.

Ao final da 48ª semana, os animais foram submetidos à eutanásia para colheita de material para avaliação microscópica. Foram coletadas três amostras por punch de biópsia de 6 mm, na linha dorsal do animal: uma no leito tumoral (LT), a segunda em margem próxima ao local da lesão (MP) em área macroscopicamente saudável e a terceira em margem distante, em sentido caudal, a 10 cm da área de lesão primária (MD) (Figuras 1 e 2). O material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-196^{\circ}\text{C}$  em botijão. Para a confecção das lâminas para processamento histoquímico e imuno-histoquímico, onde foram seccionadas em cortes de 4  $\mu\text{m}$  estendidos em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, silanizadas com adesivo comercial (3-aminopropiltrietoxissilano, Merck KGaA - Darmstadt, Alemanha).



**Figura 1.** Representação gráfica da metodologia de indução tumoral e separação dos animais em grupos controle (GC) e tratamento (GT). LT = leito tumoral, MP = margem próxima, MD = margem distante, PRP = plasma rico em plaquetas. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2018.



**Figura 2.** Imagem fotográfica ilustrando a orientação das amostras colhidas de ratos, nos quais foi induzido quimicamente lesão neoplásica de pele. LT = leito tumoral, MP = margem próxima, MD = margem distante. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2018.

## **2.2. Avaliação histológica e gradação de atipia celular**

As lâminas foram avaliadas por coloração de rotina hematoxilina-eosina para visualização de morfologia celular e gradação histológica da atipia celular e de alterações morfológicas, seguindo os critérios propostos por Bánozci et al. (1976), como pleomorfismo celular e nuclear, perda da estratificação epitelial, hipercromatismo nuclear, aumento do tamanho do núcleo, nucléolos aumentados, duplicação da camada basal, queratinização individual ou grupo de células, figuras mitóticas na porção mediana do epitélio, mitoses atípicas, aumento de figuras mitóticas, perda da arquitetura celular e formação de pérolas córneas. De acordo com o número de critérios de atipia epitelial encontrados, a gradação foi classificada em: a) leve: até dois critérios; b) moderada: de três a quatro critérios; c) intensa: cinco ou mais critérios de atipia epitelial presentes.

### **2.3. Expressão de fibras colágenas por picrosirius vermelho**

A coloração histoquímica de picrosirius vermelho foi realizada seguindo instruções do kit comercial Picrosirius Histokit® da EasyPath Diagnósticos, sendo então realizada a avaliação com utilização de microscópio óptico de luz polarizada Nikon® ECLIPSE E200 acoplado à câmera Tucsen® HD Lite e software Tucsen® TCCapture 5.1.1. Foram obtidas fotomicrografias de 7 campos aleatórios em aumento de 20X.

A mensuração da área de colágeno tipo I e colágeno tipo III foi feita com o software ImageJ® utilizando o plugin Threshold Color, conforme sugerido por Bedoya e colaboradores (2016), com base em faixas de cor padronizadas. Para o verde (colágeno tipo III), parâmetro Cor 45-120; para o vermelho (colágeno I), parâmetro Cor 0-40 e 190-255. O parâmetro de Saturação foi mantido 0-255 e o parâmetro Brilho foi estabelecido automaticamente pelo software.

### **2.4. Contagem de densidade microvascular por CD31**

Para o estudo imuno-histoquímico, os cortes foram espalhados em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, com adesivo comercial (3-aminopropiltrietoxissilano, Merck KDa - Darmstadt, Alemanha).

Os cortes obtidos foram submetidos a coloração imuno-histoquímica para marcação de CD31 pelo método de peroxidase e 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloreto (DAB). As lâminas foram descongeladas em temperatura ambiente por 10 minutos, fixadas em acetona 100% por 10 minutos e lavadas com solução tampão TBS. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado incubando as lâminas com solução comercial (solução de bloqueio de peroxidase, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) por 10 minutos, lavadas com solução tampão TBS e incubadas a 4°C por 16 horas com anticorpo primário policlonal anti-coelho Anti-CD31 ab28364 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) na diluição 1:50. Então, foram incubadas em temperatura ambiente por 45 minutos com anticorpo secundário biotinilado cabra anti-coelho IgG Dako® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) e lavadas com solução tampão TBS. Após, foi seguido protocolo de imunorreação com kit comercial Vectastain® ABC Original (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) seguindo

recomendações do fabricante. A marcação foi então realizada utilizando kit Cromogênio e Substrato DAB Novocastra® (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL, EUA) e contra-coloração com hematoxilina de Harris por 2 minutos e lavagem água corrente por 5 minutos, seguido de protocolo de rotina para diafanização do tecido.

O índice angiogênico para CD31 foi determinado pela técnica de CDMV conforme preconizado por Maeda e colaboradores (1995). Foram analisadas as áreas com maior número de vasos na profundidade da lesão. Grupos celulares endoteliais, corados positivamente e separados de vasos adjacentes, assim como vasos contendo lúmen foram contados.

A contagem dos vasos foi realizada em cinco campos, no aumento de 40X, utilizando microscópio óptico Nikon® ECLIPSE E200 acoplado à câmera Tucsen® HD Lite e software Tucsen® TCapture 5.1.1, ao qual foi adaptado um retículo para estereologia, objetivando evitar a recontagem de estruturas.

A CDMV foi determinada duas vezes por um único avaliador, em dois momentos diferentes e foi expresso como número médio de vasos em cada região estudada.

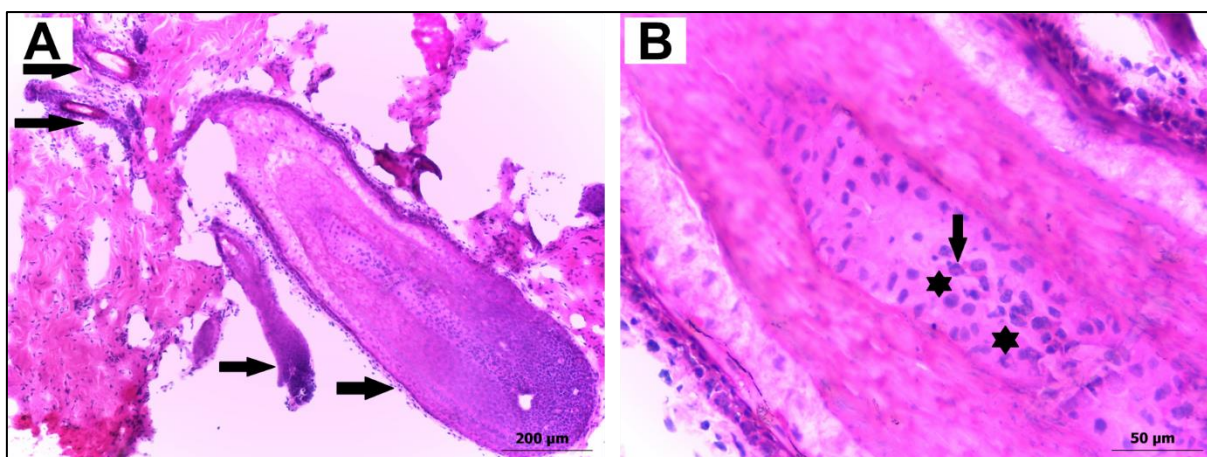
## **2.5. Análise estatística**

Os resultados do projeto foram confirmados por meio dos achados microscópicos utilizando análises histoquímicas e imuno-histoquímicas, e comprovados estatisticamente. Através do teste de Shapiro-Wilk, foram analisadas que as distribuições das variáveis Grau de Atipia Celular, Expressão de Fibras de Colágeno Tipo I e de Colágeno Tipo III seguem uma distribuição não-paramétrica, portanto para realizar as análises comparativas dessas amostras foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, ao nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Para a variável Contagem de Densidade Microvascular, que segue uma distribuição paramétrica, foram utilizados os testes de análise de variância (ANOVA) e Tukey, ao nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ). Para estas análises foi utilizado o software R 4.1.2 (Bird Hippie).

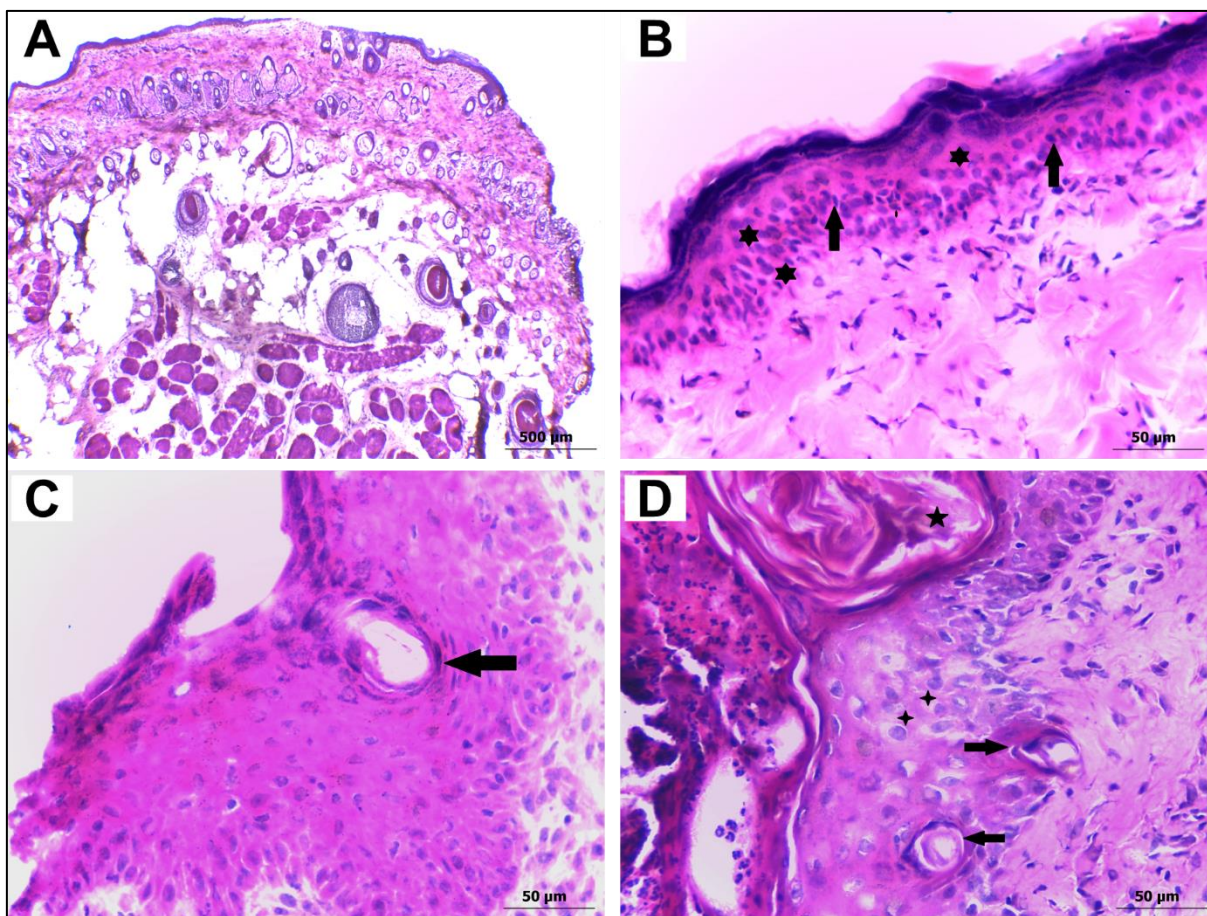
### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Avaliação histológica e gradação de atipia celular

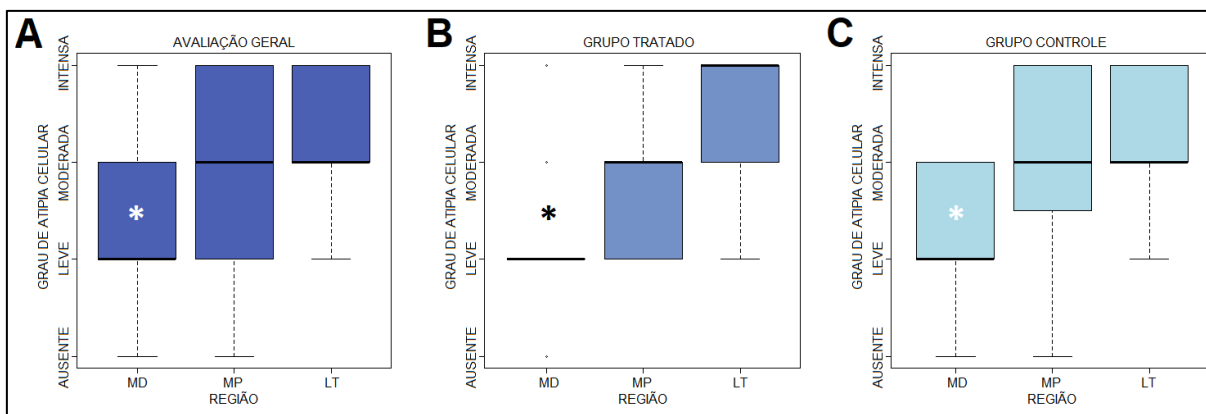
Os achados de grau de atipia celular são demonstrados nas Figuras 3 e 4. A avaliação quantitativa do grau de atipia celular à análise de variância de Kruskal-Wallis demonstrou significância ( $p < 0,05$ ) sendo verificado pelo teste post-hoc de Dunn as diferenças entre as regiões MD e LT e MD e MP. A significância prevaleceu também entre as regiões nos grupos controle e tratado (Figura 5).



**Figura 3.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Demonstração de critérios de atipia celular, segundo Bánóczy et al. (1976). **A)** (GC) Displasia anexial. Folículos pilosos de diferentes tamanhos (setas). Observe o folículo aberrante, à direita. HE. 10x. **B)** Ampliação de 40x da Imagem A. Notar anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular intrafolicular (estrelas). Nucléolos evidentes (seta). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/UNESP Botucatu/SP, 2022.



**Figura 4.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Demonstração de critérios de atipia celular, segundo Bánozci et al. (1976). **A)** (GC) Visualização geral de pele e anexos. Presença de artefatos em conjunto à tecido adiposo não corado. Notar displasia anexial com aumento do número de folículos com diferentes tamanhos destes. Espessamento epidérmico. HE, 4x. **B)** (GT) Espessamento epidérmico. Perda de estratificação parietal. Anisocitose e anisocariose (estrelas). Hiperchromatismo nuclear em diferentes camadas (setas). HE, 40x. **C)** (GC) Espessamento epidérmico focal, com desorganização das camadas e formação de pérola córnea primitiva (seta). HE, 40x. **D)** (GT) Notar crosta hemática com infiltrado inflamatório neutrofílico, hora hipersegmentados, hora degenerados. Presença de hiperqueratinização (estrela), pérolas córneas primitivas (setas), anisocariose, anisocitose e nucléolos evidentes (cruzes). HE, 40x. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia FMVZ/UNESP Botucatu/SP, 2022.

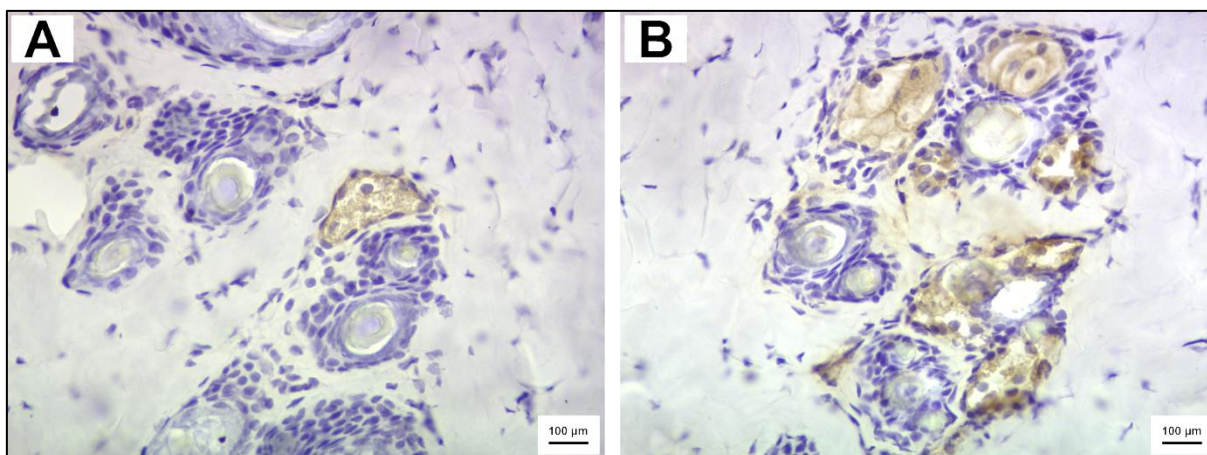


**Figura 5.** Representação gráfica da análise quantitativa do grau de atipia celular nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a região MD e as regiões MP e LT. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.

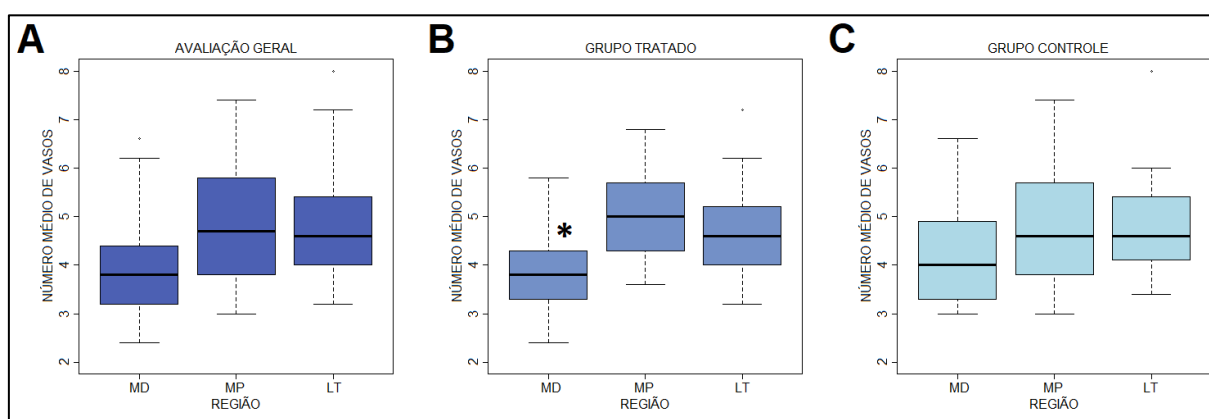
### 3.2. Contagem microvascular

Na figura 6 é apresentado a avaliação quantitativa de microvasos pela imunomarcagem de CD31. A análise de variância (ANOVA) demonstrou significância ( $p < 0,05$ ) sendo verificado pelo teste de Tukey as diferenças entre as regiões MD e LT e MD e MP. A significância prevaleceu apenas na comparação das regiões do grupo tratado (Figura 7), sendo também observada uma tendência, ainda que sem significância ( $p > 0,05$ ) no GC.

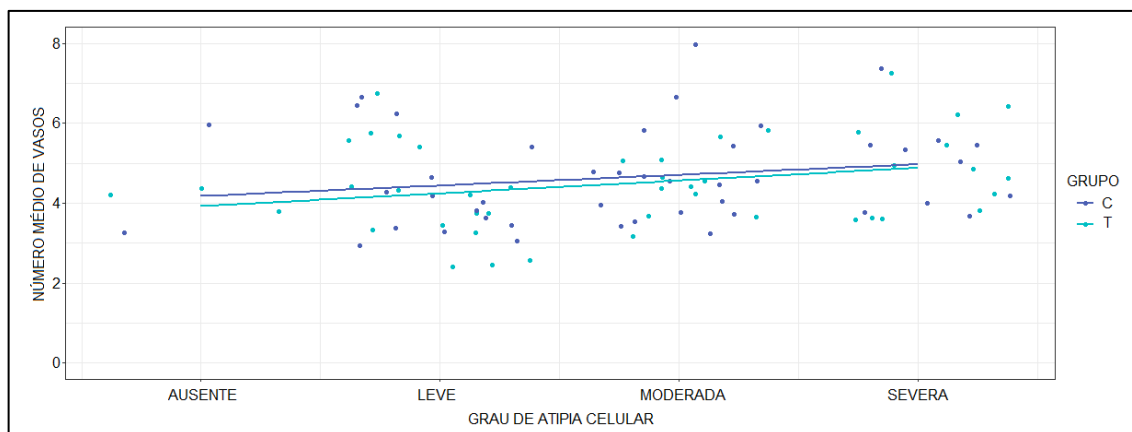
De acordo com o teste de correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ), houve uma correlação diretamente proporcional entre o número médio de vasos contados e o grau de atipia celular avaliado. Essa correlação prevaleceu tanto no GT quanto no GC (Figura 8).



**Figura 6.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Imunomarcção com CD31 e contra-coloração com hematoxilina para contagem de densidade microvascular (CDMV). Aumento de 40x. **A)** Região com baixa densidade microvascular. **B)** Região com alta densidade microvascular. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.



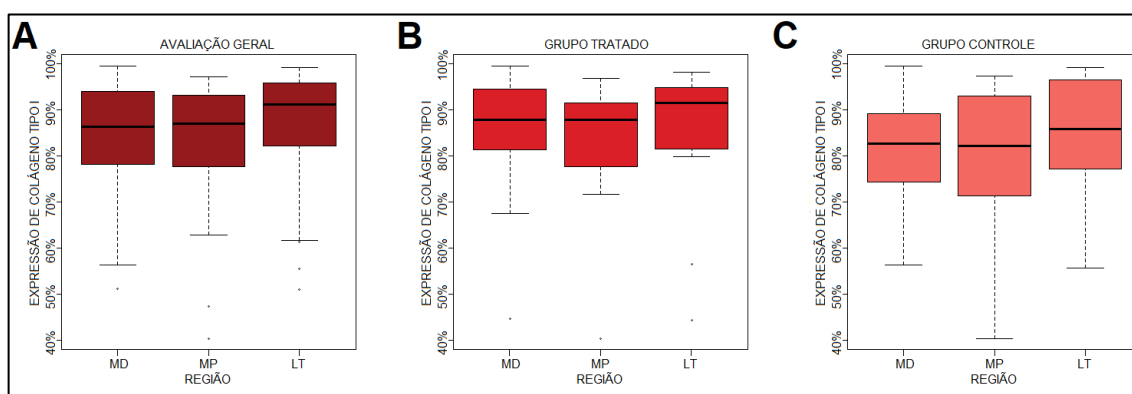
**Figura 7.** Representação gráfica da análise quantitativa do número médio de vasos nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. \* Diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a região MD e as regiões MP e LT. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.



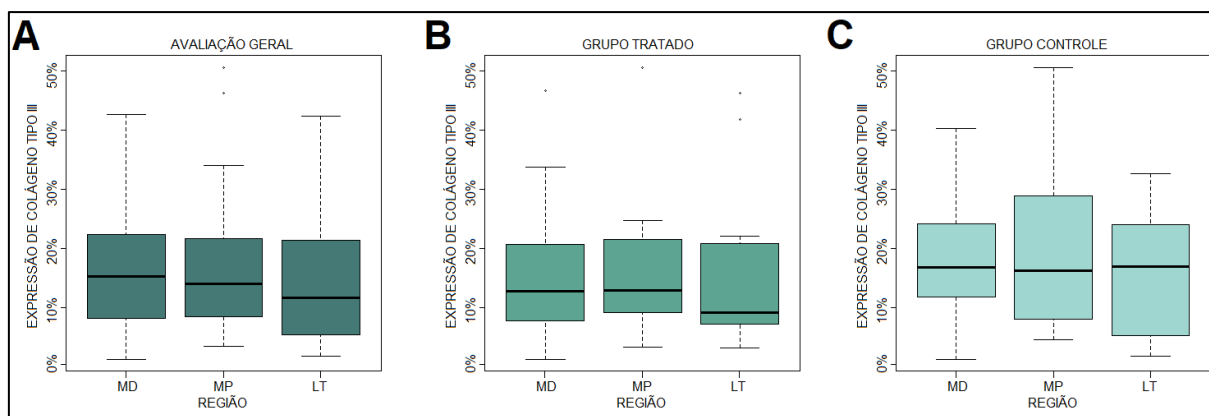
**Figura 8.** Representação gráfica da correlação observada ( $p < 0,05$ ) entre o número médio de vasos contados e o grau de atipia celular nos grupos Tratado (T) e Controle (C). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.

### 3.3. Expressão de colágenos tipo I e tipo III

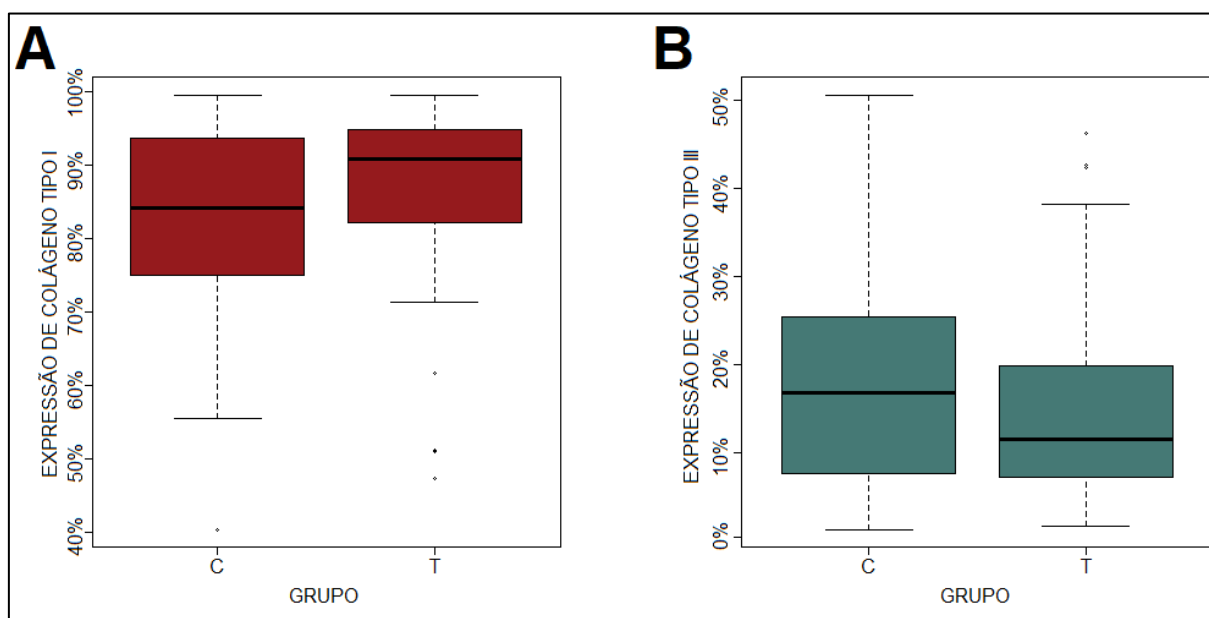
A expressão colágeno tipo I e III pela coloração de picrossirius vermelho, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis (Figuras 9 e 10). Ainda assim, observou-se tendência no GT a uma maior expressão de colágeno tipo I em relação ao GC (Figura 11).



**Figura 9.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo I nas regiões avaliadas. A) Avaliação geral. B) Avaliação no GT. C) Avaliação no GC. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.



**Figura 10.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo III nas regiões avaliadas. **A)** Avaliação geral. **B)** Avaliação no GT. **C)** Avaliação no GC. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.



**Figura 11.** Representação gráfica da expressão de colágeno tipo I **(A)** e tipo III **(B)** nos grupos Tratado e Controle. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Avaliação histológica e gradação de atipia celular

O grau de atipia elevado em região de LT em relação a MD e MP em relação a MD ( $p < 0,05$ ) é compatível com os achados de Masa e colaboradores (2013), que observaram intenso grau de atipia celular em região de aplicação de DMBA. A atipia celular observada, ainda que não correspondente a lesões de CEC, é compatível com lesões de ceratose actínica, comprovando a eficácia do DMBA na indução da carcinogênese por mutação da síntese do DNA.

A exérese das lesões neoplásicas após as primeiras 24 semanas foi realizada com margens amplas, de forma a avaliar a influência do PRP na recidiva tumoral. Foi observada uma tendência, porém não significativa ( $p > 0,05$ ), de maior grau de atipia celular nos animais do GT (observar linha mediana da região LT na comparação dos grupos da Figura 4). Esse achado pode estar relacionado ao uso de PRP no leito tumoral, uma vez que os fatores de crescimento e citocinas podem servir como agentes da perpetuação dos mecanismos oncogênicos.

Pazzini e colaboradores (2021) investigaram pela primeira vez o uso de PRP em leito cirúrgico de lesões neoplásicas, com o objetivo de verificar se a aplicação de fatores que estimulam a proliferação vascular pode causar a recidiva local. O PRP é um importante indutor de crescimento vascular devido às concentrações elevadas de estimuladores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias (Kim et al., 2011; Spartalis et al., 2014; Abuaf et al., 2016; Badran et al., 2018; Luzo et al., 2020). Dessa forma, o estímulo angiogênico causado pelo PRP no sítio tumoral, ainda que não significativo em relação ao GC, pode ser observado em uma maior tendência de grau intenso de atipia em LT de GT em relação a GC. Estes achados são corroborados pelas conclusões de Spartalis et al. (2014), Spartalis et al. (2017) e Luzo et al. (2020) onde, ainda que não comprovada a interação do PRP com células cancerígenas, este não deve ser utilizado em leitos tumorais até que mais estudos da interação do PRP com o leito tumoral sejam realizados.

Os resultados deste estudo ainda expõe a interação do DMBA e sua capacidade pró-neoplásica em região de LT e MP, demonstrando que, apesar de a

avaliação histológica de margens de segurança da exérese tumoral estar livre de comprometimento, a necessidade de novas técnicas de avaliação das margens de segurança se mostram necessárias para um melhor entendimento da capacidade de recidiva do tumor, buscando marcadores capazes de detectar o risco de recidiva prévio às alterações de morfologia celular, uma vez que a exérese neoplásica onde há comprometimento das margens cirúrgicas eleva o risco de recidiva local e aumento do grau de agressividade tumoral quando há recidiva, conforme apontam os estudos de Spyropoulou e colaboradores (2019), Girardi e colaboradores (2020) e Svenson e Paoli (2020).

#### **4.2. Contagem microvascular**

A molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1 / CD31) é uma glicoproteína da superfamília de moléculas de adesão musculares, expressada exclusivamente por células do sistema vascular (plaquetas, monócitos, neutrófilos, células T e células endoteliais). No desenvolvimento do organismo, a CD31 é altamente expressada em células endoteliais de vasos existentes e novos vasos sanguíneos e linfáticos formados, sendo muito utilizada como marcador de células endoteliais para contagem vascular (Ilan e Madri, 2003).

O uso da imunomarcção por CD31 para estudo de angiogênese tumoral é bastante encontrado na literatura, sendo esta considerada uma ferramenta de análise do comportamento tumoral, uma vez que se observa uma correlação positiva entre o aumento do número de vasos com a progressão tumoral (Kampoli et al., 2022). Logo, o uso de imuno-histoquímica também tem sido uma boa ferramenta para avaliação da angiogênese na qual obtém-se a contagem de densidade microvascular (CDMV) expressada pelo imunomarcador de CD31, técnica utilizada na literatura para contagem de vasos (Maeda et al., 1995; Teófilo, 2012; Pazzini et al., 2017).

O aumento do número médio de vasos contados em regiões de LT e MP em relação à MD pode ter relação ao efeito de angiogênese que neoplasmas como o CEC podem apresentar, também observado por Teófilo (2012). Em seu estudo, Teófilo descreve o achado de diversos pesquisadores onde a progressão da malignidade da lesão acompanha o aumento do número médio de vasos. Da mesma forma,

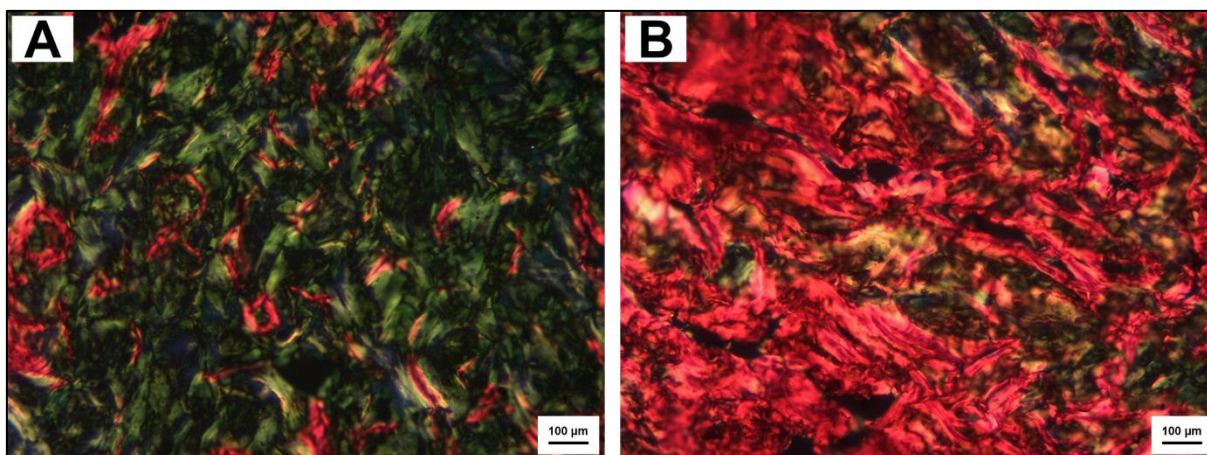
Shivamallappa e colaboradores (2011) observaram que o aumento do número médio de vasos é observado em lesões de CEC oral, enquanto lesões de displasia epitelial não apresentaram diferença no número médio de vasos em relação ao epitélio saudável. Esse resultado está de acordo com o fator de indução de angiogênese que neoplasmas com maior nível de malignidade apresentam localmente.

Os valores tendem a um aumento no GT em relação ao GC, apesar de não apresentar resultados significativos ( $p>0,05$ ), pode-se inferir a influência do uso de PRP, que possui fatores que estimulam a angiogênese, sendo os resultados obtidos nesse estudo semelhantes ao de Pazzini e colaboradores (2017), que observou aumento significativo da densidade microvascular em lesões cutâneas de coelhos onde foi aplicado PRP.

#### **4.3. Expressão de colágenos tipo I e tipo III**

O principal uso da coloração de picrosirius vermelho é na coloração e diferenciação dos tipos de colágeno (Weatherford, 1972), porém ela também tem sido utilizada para o diagnóstico diferencial de neoplasmas fibrocísticos (Koren et al., 2001). A coloração de picrosirius vermelho é uma das técnicas histoquímicas mais bem entendidas e estudadas, pois se baseia nas propriedades naturais de birrefringência das fibras colágenas (Figura 12), tornando essa coloração mais específica que técnicas como Tricômico de Masson e Van Gieson (Rittié, 2017).

Ademais, a expressão de fibras de colágeno tipos I e III através de coloração histoquímica Picrosirius Vermelho, também é um método de análise para avaliar e quantificar a porcentagem expressa de fibras colágenas em lesões. Essa quantificação tem sido utilizada por diversos autores como método de avaliação prognóstico e comportamental para lesões metastáticas e recidivantes, predição de sobrevida e risco de metástase em diversos tipos de neoplasmas (Rosen et al., 2020; Garcia et al., 2021; Morkunas et al., 2021).



**Figura 12.** Fotomicrografias de neoplasma de pele induzido quimicamente em ratos. Luz polarizada, coloração histoquímica de picrosirius vermelho. **A)** Região com alta expressão de fibras colágenas tipo III (verde). **B)** Região alta expressão de fibras colágenas tipo I (vermelho). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias FCAV/UNESP Jaboticabal/SP, 2021.

Na pele normal, os colágenos tipo I e III representam predominância de expressão, com 87% e 10% respectivamente (Miller et al., 2013). Neste estudo, o colágeno tipo I foi predominante em relação ao tipo III.

Logo, é importante citar os achados de Cardona e colaboradores (2013), que encontraram maior expressão de colágeno tipo I em CCEs de bovinos e ausência de expressão de colágeno tipo III. Estes autores inferem que este achado demonstra a baixa capacidade de reposta regenerativa que o organismo possui frente ao processo de carcinogênese, uma vez que as fibras colágenas tipo III são observada enquanto há a reparação tecidual e, uma vez que processo tenha ocorrido, há a substituição do colágeno tipo III em tipo I.

Ainda é importante citar que, embora não significante, no presente estudo, foi observada uma maior tendência de expressão do colágeno de tipo I nos animais do GT. Este achado é compatível com o de Pazzini e colaboradores (2018) que observaram diferença significativa de expressão de colágeno tipo I no leito cicatricial de coelhos que receberam tratamento com PRP em relação ao grupo controle. Elghblawi (2017) e Badran e Nabili (2018) apontaram em seus estudos o papel bem

definido e comprovado do PRP na síntese e maturação do colágeno, seus fatores angiogênicos e indutores de reparação tecidual, o que leva a uma cicatrização mais rápida, manutenção do arcabouço normal da derme e adequada reposição da matriz tecidual densa, características associadas à maior expressão de colágeno tipo I, conforme apontado por Lima e colaboradores (2020).

Ainda assim, uma maior expressão de colágeno tipo I foi observada por Cheng e Leung (2011) em tumores sólidos e com alta capacidade invasiva e metastática, assim como Samal e colaboradores (2012) observaram em seu estudo que CCEs de glândula salivar apresentaram predominância de expressão de fibras colágenas tipo I em relação a tumores benignos de glândula salivar, que apresentaram predominância de expressão de colágeno tipo III.

Dessa forma, a maior expressão de colágeno tipo I pode estar relacionada tanto a uma resposta bem definida de reparação tecidual quanto em lesões neoplásicas de alto caráter de malignidade. Sugere-se então que a avaliação da expressão de fibras colágenas deve estar acompanhada de outros fatores como a avaliação histológica para presença de células neoplásicas e o método de gradação de atipia celular, pois como único fator de avaliação não é possível inferir se a expressão de fibras colágenas de tipo I está ou não relacionada à recidiva tumoral.

## **5. CONCLUSÃO**

Dado o exposto, é possível concluir que aos moldes de neoplasmas de pele quimicamente induzidos, as margens cirúrgicas de 5mm são insuficientes para evitar a recidiva de lesões tumorais, bem como a avaliação histológica para visualização de células tumorais em bordos cirúrgicos é um critério insuficiente para detectar alterações teciduais pré-neoplásicas e pode acarretar no comprometimento da eficácia terapêutica. Conclui-se ainda que a CDMV e gradação de atipia celular são fatores correlatos e podem indicar alterações teciduais que antecedem a formação neoplásica.

## 6. REFERÊNCIAS

Abuaf OK, Yildiz H, Baloglu H, et al. (2016) Histologic evidence of new collagen formulation using platelet rich plasma in skin rejuvenation: a prospective controlled clinical study. **Annals of Dermatology**. 28: 718-724.

Amar A, Curioni OA, Franzi AS, Rapoport A (2005) Recidivas locais após tratamento cirúrgico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágio avançado. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**. 32:60-63.

Badran KW, Nabili V (2018) Lasers, Microneedling, and Platelet-Rich Plasma for Skin Rejuvenation and Repair. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**. 26:455-468.

Bánozci J, Csiba A (1976) Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. **Oral Surgery**. 42:766-774.

Bedoya SAO, Conceição LG, Vilorio MIV, et al. (2016) Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 68:147-154.

Cardona JAA, Vargas MIV, Perdomo SCA (2013) Clinical and Histopathological Study of the Squamous Cell Carcinoma in Cattle of the Cordoba Department, Colombia. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**. 54:68-77.

Cheng JC, Leung PC (2011) Type I collagen down-regulates E-caderin expression by increasing PI3KCA in cancer cells. **Cancer Letters**. 304:07-233.

Elghblawi E (2017) Platelet-rich plasma, the ultimate secret for youthful skin elixir and hair growth triggering. **Journal of Cosmetic Dermatology**. 1:1-8.

Fernandez-Figueiras MT, Carrato C, Saenz X, et al. (2015) Actinic keratosis with atypical basal cells (AK I) is the most common lesion associated with invasive squamous cell carcinoma of the skin. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**. 29:991-997.

Garcia APV, Reis LA, Nunes FC, et al. (2021) Canine mammary câncer tumour behavior and patient survival time are associated with collagen fibre characteristics. **Scientific Reports**. 11:1-13.

Girardi FM, Wagner VP, Martins MD, Abentroth AL, Hauth LA (2020) Factors associated with incomplete surgical margins in basal cell carcinoma of the head and neck. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. 87:695-701.

Howel JY, Ramsey ML (2021) Squamous Cell Skin Cancer. **StatPearls Publishing** [internet]. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441939/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441939/)

Ilan N, Madri JA (2003) PECAM-1: old friend, new partners. **Current Opinion in Cell Biology**. 15:515-524.

Instituto Nacional de Câncer - INCA (2021) Detecção Precoce do Câncer. **Ministério da Saúde**. Rio de Janeiro.

Kampoli K, Foukas PG, Ntavatzikos A, et al. (2022) Interrogating the interplay of angiogenesis and immunity in metastatic colorectal cancer. **World Journal of Methodology**. 12:43-53.

Kim DH, Je YJ, Kim CD, et al. (2011) Can platelet-rich plasma be used for skin rejuvenation? Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human dermal fibroblast. **Annals of Dermatology**. 23:424-431.

Kopke LFF, Andrade Filho JS (2005) Margem de segurança: um conceito antigo e relativo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 80:279-286.

Koren R, Yaniv E, Kristt D, et al. (2001) Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picosirius red: Role in differential diagnoses. **Acta Histochemistry**. 103:151-157.

Lima IC, Wu SV, Silva LM, et al. (2020) Quantificação de colágeno tipos I e III em lesões de pele de pacientes portadores de hanseníase. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. 11:1-8.

Łojarczyk A, Łopuszyński W, Szadkowski M, et al. (2021) Aggressive squamous cell carcinoma of the cranium of a dog. **BMC Veterinary Research**. 17:1-8.

Luzo ACM, Fávaro WJ, Seabra AB, Durán N (2020) What is the potential use of platelet-rich-plasm (PRP) in cancer treatment? A mini review. **Heliyon**. 6:1-9.

Maeda S, Chung YS, Takatsuka S, et al. (1995) Tumor angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicator in gastric carcinoma. **British Journal of Cancer**. 72:319-323.

Masa APP, Severo MLB, Carmo ED, et al. (2013) Vascularização e grau de atipia epitelial em lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas. **Revista Pesquisa em Saúde**. 14:27-30.

Meleo KA (1997) Tumors of the Skin and Associated Structures. **Radiation Oncology**. 27:73-94.

Miller WH, Griffin CE, Campbell KL (2013) Structure and Function of the Skin. In.: Miller WH, Griffin CE, Campbell KL (Eds.) **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. Estados Unidos, p. 19-115.

Morkunas M, Zilenaite D, Laurinaviciene A, et al. (2021) Tumor collagen framework from bright-field histology images predicts overall survival of breast carcinoma patients. **Scientific Reports**. 11:1-13.

Oliveira KD, Avanzo GU, Tedardi MV, et al. (2015) Chemical carcinogenesis by DMBA (7,12-dimethylbenzanthracene) in female BALB/c mice: new facts. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**. 52:125-133.

Pazzini JM, Serafim EL, Gärtner F, et al. (2017) Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 37:1519-1525.

Pazzini JM, Serafim EL, Uscategui RRA, et al. (2018) Surgical sponge associated with platelets rich plasma in skin mesh grafts and layer in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 70:1339-1348.

Pazzini JM, Moreira SM, Cassino P, et al. (2021) Skin graft associated with platelet-rich plasma in correcting extensive injuries resulting from the resection of skin cancer chemically induced in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. 36:1-9.

Pinello L, Pires I, Castro AF, et al. (2022) Cross Species Analysis and Comparison of Tumors in Dogs and Cats, by Age, Sex, Topography and Main Morphologies. Data from Vet-OncoNet. **Veterinary Sciences**. 9:1-18.

Prado SM, Cedrún JL, Rey RL, et al. (2010) Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. **Experimental Molecular Pathology**. 89:197-203.

Rittié L (2017) Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. In.: Rittié L (Eds.) **Fibrosis. Methods in Molecular Biology**. Estados Unidos, p. 395-407.

Rosen S, Brisson BK, Durham AC, et al. (2020) Intratumoral collagen signatures predict clinical outcomes in feline mammary carcinoma. **PLoS One**. 15:1-22.

Samal ME, Vila RE, Asis OG, et al. (2012). Identificación de colágeno I y III com picrosirius red / polarización em el estroma de tumores salivares. **International Journal of Odontostomatology**. 6:59-64.

Schmitz L, Gambichler T, Kost C, et al. (2019) Cutaneous squamous cell carcinomas are associated with basal proliferating actinic keratoses. **British Journal of Dermatology**. 180:916-921.

Shivamallappa SM, Venkatraman NT, Shreedhar B, Mohanty L, Shenoy S (2011) Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. **International Journal of Oral Science**. 3:216-224.

Spartalis E, Tomos P, Dimitroulis D, Kouraklis G (2014) Platelet-Rich Plasma in Surgical Oncology. **Surgical Innovation**. 21:441.

Spartalis E, Tsilimigras DI, Charalampoudis P, et al. (2017) The “Yin and Yang” of Platelet-rich Plasma in Breast Reconstruction After Mastectomy or Lumpectomy for Breast Cancer. **Anticancer Research**. 37:6557-6562.

Spyropoulou FA, Pavlidis L, Trakatelli M, et al. (2020) Cutaneous squamous cell carcinoma with incomplete margins demonstrate higher tumour grade on re-excision. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. 34:1478-1481.

Svenson H, Paoli J (2020) Clinicopathological Factors Associated with Incomplete Excision of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. **Acta Dermato-Venereologica**. 100:1-5.

Teófilo, CR (2012) **Expressão de CD31, CD34 e triptase em lesões potencialmente malignas e nos carcinomas de células escamosas orais**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Vendramin FS, Franco D, Franco TR (2010) Utilização do plasma rico em plaquetas autólogo nas cirurgias de enxertos cutâneos em feridas crônicas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. 25:589-594.

Weatherford TW (1972) Staining of collagenous and non-collagen structures with picrosirius red F3BA. **The Alabama Journal of Medical Sciences**. 9:383-388.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE A

**Tabela suplementar 1: Escore de atipia celular, expressão de CD31 e Colágenos tipo I e III por coloração de picrosírius vermelho nas diferentes regiões avaliadas de ratos após exérese de neoplasma de pele quimicamente induzido.**

| Animal | Grupo | Região | Escore Atipia | Expressão CD31 | Expressão Colágeno I | Expressão Colágeno III |
|--------|-------|--------|---------------|----------------|----------------------|------------------------|
| 1      | C     | MD     | moderada      | 3,2            | 13,84                | 82,58                  |
|        |       | LT     | moderada      | 3,8            | 7,94                 | 90,74                  |
|        |       | MP     | intensa       | 5,4            | 1,59                 | 97,82                  |
| 2      | C     | MD     | leve          | 3,2            | 4,67                 | 93,96                  |
|        |       | LT     | intensa       | 3,8            | 16,92                | 79,83                  |
|        |       | MP     | leve          | 4,6            | 35,53                | 55,58                  |
| 3      | T     | MD     | leve          | 2,4            | 46,60                | 51,17                  |
|        |       | LT     | moderada      | 5,6            | 22,66                | 74,98                  |
|        |       | MP     | moderada      | 5              | 41,71                | 50,94                  |
| 4      | C     | MD     | leve          | 3              | 36,83                | 56,38                  |
|        |       | LT     | moderada      | 3,8            | 55,36                | 40,42                  |
|        |       | MP     | intensa       | 5,4            | 27,63                | 61,25                  |
| 5      | T     | MD     | leve          | 2,4            | 1,34                 | 99,48                  |
|        |       | LT     | leve          | 5,4            | 20,47                | 77,63                  |
|        |       | MP     | moderada      | 3,6            | 22,04                | 83,71                  |
| 6      | T     | MD     | leve          | 3,8            | 9,94                 | 92,96                  |
|        |       | LT     | leve          | 6,8            | 23,38                | 79,03                  |
|        |       | MP     | moderada      | 3,2            | 21,45                | 82,07                  |
| 7      | C     | MD     | ausente       | 3,2            | 1,25                 | 99,39                  |
|        |       | LT     | ausente       | 6              | 10,35                | 92,21                  |
|        |       | MP     | intensa       | 3,6            | 18,31                | 87,49                  |
| 8      | T     | MD     | ausente       | 4,2            | 6,98                 | 95,32                  |
|        |       | LT     | leve          | 5,8            | 13,12                | 88,04                  |
|        |       | MP     | leve          | 5,6            | 4,52                 | 97,31                  |
| 9      | C     | MD     | leve          | 4              | 0,98                 | 99,42                  |
|        |       | LT     | leve          | 3              | 32,47                | 71,29                  |
|        |       | MP     | leve          | 5,4            | 29,90                | 74,95                  |
| 10     | T     | MD     | ausente       | 4,4            | 33,76                | 71,32                  |
|        |       | LT     | intensa       | 6,4            | 3,43                 | 97,13                  |
|        |       | MP     | intensa       | 3,8            | 5,43                 | 95,78                  |
| 11     | T     | MD     | leve          | 2,6            | 4,92                 | 96,83                  |
|        |       | LT     | leve          | 3,8            | 8,92                 | 93,17                  |
|        |       | MP     | intensa       | 4,2            | 8,16                 | 94,96                  |
| 12     | C     | MD     | moderada      | 4,4            | 43,90                | 60,67                  |
|        |       | LT     | intensa       | 5,4            | 4,61                 | 97,15                  |
|        |       | MP     | intensa       | 4,2            | 1,80                 | 99,03                  |
| 13     | C     | MD     | leve          | 3,8            | 36,77                | 66,48                  |
|        |       | LT     | intensa       | 5,6            | 17,41                | 86,00                  |
|        |       | MP     | intensa       | 5              | 23,13                | 84,17                  |
| 14     | T     | MD     | leve          | 3,2            | 28,43                | 77,62                  |
|        |       | LT     | moderada      | 4,4            | 50,57                | 47,43                  |
|        |       | MP     | intensa       | 7,2            | 46,21                | 61,58                  |
| 15     | T     | MD     | moderada      | 3,6            | 12,81                | 89,53                  |
|        |       | LT     | intensa       | 3,6            | 24,69                | 81,28                  |
|        |       | MP     | intensa       | 4,6            | 7,16                 | 95,68                  |

**Tabela suplementar 1: Escore de atipia celular, expressão de CD31 e Colágenos tipo I e III por coloração de picrosirius vermelho nas diferentes regiões avaliadas de ratos após exérese de neoplasma de pele quimicamente induzido (continuação).**

| Animal | Grupo | Região | Escore Atipia | Expressão CD31 | Expressão Colágeno I | Expressão Colágeno III |
|--------|-------|--------|---------------|----------------|----------------------|------------------------|
| 16     | T     | MD     | leve          | 3,4            | 16,56                | 86,70                  |
|        |       | LT     | leve          | 4,4            | 9,53                 | 91,67                  |
|        |       | MP     | intensa       | 6,2            | 13,24                | 90,86                  |
| 17     | T     | MD     | ausente       | 3,8            | 8,53                 | 94,80                  |
|        |       | LT     | leve          | 5,6            | 5,32                 | 96,44                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4,6            | 3,28                 | 98,28                  |
| 18     | C     | MD     | leve          | 6,6            | 18,10                | 83,65                  |
|        |       | LT     | intensa       | 4              | 4,61                 | 96,51                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4              | 2,93                 | 98,50                  |
| 19     | T     | MD     | leve          | 4,4            | 12,31                | 89,21                  |
|        |       | LT     | intensa       | 3,6            | 12,99                | 89,11                  |
|        |       | MP     | intensa       | 5              | 9,16                 | 92,33                  |
| 20     | C     | MD     | moderada      | 6,6            | 15,31                | 87,17                  |
|        |       | LT     | moderada      | 4,8            | 23,20                | 77,85                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4,6            | 16,47                | 85,67                  |
| 21     | C     | MD     | leve          | 4,2            | 11,16                | 91,10                  |
|        |       | LT     | moderada      | 3,6            | 5,01                 | 95,56                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4              | 5,38                 | 96,45                  |
| 22     | T     | MD     | intensa       | 5,8            | 22,35                | 81,83                  |
|        |       | LT     | moderada      | 5              | 10,85                | 91,35                  |
|        |       | MP     | intensa       | 5,4            | 20,14                | 83,54                  |
| 23     | C     | MD     | moderada      | 3,4            | 28,25                | 70,34                  |
|        |       | LT     | moderada      | 5,8            | 37,05                | 62,85                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4,8            | 24,85                | 78,65                  |
| 24     | C     | MD     | moderada      | 5,4            | 24,23                | 78,10                  |
|        |       | LT     | leve          | 6,4            | 30,86                | 71,11                  |
|        |       | MP     | moderada      | 8              | 5,46                 | 96,31                  |
| 25     | T     | MD     | leve          | 3,4            | 19,14                | 85,17                  |
|        |       | LT     | leve          | 4,4            | 11,57                | 90,74                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4,4            | 8,65                 | 94,45                  |
| 26     | C     | MD     | leve          | 4,2            | 16,71                | 85,80                  |
|        |       | LT     | leve          | 3,6            | 8,95                 | 93,58                  |
|        |       | MP     | leve          | 3,4            | 11,56                | 91,24                  |
| 27     | C     | MD     | leve          | 3,4            | 23,37                | 81,58                  |
|        |       | LT     | moderada      | 4,6            | 31,85                | 69,74                  |
|        |       | MP     | moderada      | 6              | 27,34                | 75,46                  |
| 28     | T     | MD     | leve          | 4,2            | 16,32                | 88,58                  |
|        |       | LT     | moderada      | 5,8            | 17,48                | 85,92                  |
|        |       | MP     | intensa       | 4,8            | 11,07                | 91,20                  |
| 29     | C     | MD     | leve          | 6,2            | 22,50                | 80,93                  |
|        |       | LT     | intensa       | 7,4            | 21,01                | 82,06                  |
|        |       | MP     | moderada      | 4,6            | 19,84                | 84,18                  |
| 30     | T     | MD     | moderada      | 4,6            | 3,88                 | 97,17                  |
|        |       | LT     | moderada      | 4,2            | 7,54                 | 94,53                  |
|        |       | MP     | intensa       | 3,6            | 7,46                 | 93,72                  |