

JÉSSICA MIRANDA COTA

**RECEPTORES PARA ÁCIDO RETINÓICO NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS CUTÂNEO E CERATOSE ACTÍNICA EM CÃES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição

Coorientadora: Simone Eliza F. Guimarães

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C843e
2024 Cota, Jéssica Miranda, 1992-
Receptores para ácido retinóico no carcinoma de células
escamosas e ceratose actínica em cães / Jéssica Miranda Cota. –
Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (47 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 34-45.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.260>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças. 2. Ceratose actínica. 3. Carcinoma de
células escamosas. 4. Retinoide. 5. Imunohistoquímica.
I. Conceição, Lissandro Gonçalves, 1963-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.70896544

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB-6/2523


JÉSSICA MIRANDA COTA

**RECEPTORES PARA ÁCIDO RETINÓICO NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS CUTÂNEO E CERATOSE ACTÍNICA EM CÃES**


Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 07 de junho de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **JESSICA MIRANDA COTA**
Data: 06/09/2024 17:32:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jéssica Miranda Cota
Autor

Documento assinado digitalmente
 **LISSANDRO GONCALVES CONCEICAO**
Data: 07/09/2024 21:02:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lissandro Gonçalves Conceição
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Ailton e Lucilea, que foram os meus alicerces e maiores apoiadores ao longo desses anos. Os quais me educaram e ensinaram a correr atrás dos meus objetivos e a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu marido, Heitor, pelo amor incondicional, apoio e por tudo o que faz por mim. És um grande exemplo que sigo, minha inspiração. Seja nos momentos de tristeza, ou nas conquistas, você esteve ao meu lado, me impulsionando a ir além.

Aos meus irmãos, João Paulo e Izadora, vocês são minha fonte de força e alegria, e sou imensamente grata por tê-los ao meu lado.

Ao meu orientador, Lissandro, expresso minha sincera gratidão pela orientação e contribuição. Obrigada por acreditar em mim, pela dedicação no meu crescimento pessoal e profissional ao longo dos últimos anos durante a residência, mestrado e agora no doutorado e por ser um mentor na minha vida.

Aos membros da banca pela disponibilidade em participar deste importante momento e contribuírem com valiosas considerações.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

RESUMO

COTA, Jéssica Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2024. **Receptores para ácido retinóico no carcinoma de células escamosas cutâneo e ceratose actínica em cães.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Coorientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães.

A ceratose actínica (CA) e o carcinoma de células escamosas (CCE) são comumente observado em cães e gatos de pelagem e/ou pele clara e histórico de exposição crônica aos raios ultravioleta (UV). Apesar da ressecção cirúrgica ser a terapia de eleição para o CCE, esta pode promover danos estéticos indesejáveis e prejudicar a capacidade funcional, a depender da localização do tumor. Diante disso, o CCE é um desafio clínico, sendo necessária a investigação de outras modalidades terapêuticas. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão dos receptores de ácido retinóico (RAR- α , RAR- β e RAR- γ) na CA e no CCE em cães. Foi realizado um estudo com 26 lesões (blocos de parafina), diagnosticadas como CCE e CA em cães. Os CCE foram classificados como moderadamente diferenciados (MD) e bem diferenciados (BD). Foi utilizada a técnica de *Western blotting* (WB), para confirmar a expressão de anticorpos anti-RAR α , β e γ humanos comercialmente disponível para o homólogo canino. Posteriormente, as lesões selecionadas, foram submetidas à técnica de IHQ para verificar a expressão destes receptores. No estudo, os anticorpos RAR- α , RAR- γ e RAR- β foram expressos no tecido controle e tumoral através da técnica de WB, porém os anticorpos RAR- α e RAR- γ não apresentaram marcação nuclear evidente no controle positivo pela técnica de IHQ. Todas as 26 lesões diagnosticadas como CA e CCE analisadas no estudo, expressaram o RAR- β . Nos grupos MD e CA, a maioria das lesões apresentou mais que 75% de células marcadas para o anticorpo. A maioria dos casos de carcinoma BD (12/15), MD (6/8) e CA (2/3) apresentaram imunomarcção nuclear forte para o RAR- β , o que diferiu significativamente dentro de cada grupo. As lesões classificadas como CA apresentaram maior percentual de células com expressão intermediária, diferindo dos outros grupos. Em todas as lesões, a marcação nuclear foi evidente e nenhum dos casos apresentou coloração restrita ao citoplasma. Os achados desta pesquisa demonstram a presença dos RAR- β nas lesões diagnosticadas como CA e CCE. A compreensão da expressão dos receptores de retinóides na medicina veterinária poderá proporcionar alternativas para a terapia específica em pacientes caninos com CA e CCE.

Palavras-chave: Dermatose solar. Retinóides. Receptor. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

COTA, Jéssica Miranda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2024. **Receptors for retinoic acid in cutaneous squamous cell carcinoma and actinic keratosis in dogs.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães.

Actinic keratosis (AC) and squamous cell carcinoma (SCC) are commonly found in dogs and cats with light coats and/or skin and a history of chronic exposure to ultraviolet (UV) rays. Although surgical resection is a therapy of choice for SCC, it can cause undesirable aesthetic damage and impair functional capacity, depending on the location of the tumor. Therefore, SCC is a clinical challenge, requiring the investigation of other therapeutic modalities. The aim of this study was to investigate the expression of retinoic acid receptors (RAR- α , RAR- β and RAR- γ) in AC and SCC in dogs. A study was carried out with 26 lesions (paraffin blocks), found as SCC and CA in dogs. SCC were classified as moderately differentiated (MD) and well differentiated (BD). The Western blotting (WB) technique was used to confirm the expression of commercially available human anti-RAR α , β and γ antibodies to the canine homologue. Subsequently, the selected lesions were subjected to the IHC technique to verify the expression of these receptors. In the study, the RAR- α , RAR- γ and RAR- β antibodies were expressed in control and tumor tissue using the WB technique, but the RAR- α and RAR- γ antibodies did not demonstrate evident nuclear labeling in the positive control using the WB technique. IQQ. All 26 lesions presented as CA and SCC proven in the study manifested RAR- β . In the MD and CA groups, the majority of lesions had more than 75% of cells labeled for the antibody. Most cases of BD (12/15), MD (6/8) and CA (2/3) carcinomas showed strong nuclear immunostaining for RAR- β , which differs significantly within each group. Discussions about CA had a higher percentage of cells with shared expression, differentiating them from other groups. In all lesions, nuclear staining was evident and none of the cases showed classification restricted to the cytoplasm. The results of this research demonstrate the presence of RAR- β in lesions produced such as CA and SCC. Understanding the expression of retinoid receptors in veterinary medicine may provide alternatives for specific therapy in canine patients with CA and SCC.

Keywords: Solar dermatosis. Retinoids. Receiver. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Lesões diagnosticadas como CCE com intensidade da imunomarcção nuclear para o anticorpo RAR- β fraca (A), intermediário (B) e forte (C) (IHQ contracorado com hematoxilina 100 X).23
- Figura 2. SDS-PAGE (Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com SDS) no tecido canino. Uma amostra de extrato proteico contendo 12 μ L foi aplicada em cada uma das canaletas. As colunas representam da esquerda para a direita, respectivamente: marcador de peso molecular (MM), pele (P), músculo (MU), pulmão (PU) e tumor (T). Foram três grupos de quatro bandas; cada grupo para cada anticorpo RAR α , β e γ , respectivamente. A visualização das bandas do gel de SDS Page 10% se deu pela coloração com *Blue Commassie*.25
- Figura 3. *Western Blotting*. Em cada uma das canaletas foi adicionado 12 μ L da amostra de extrato proteico. As colunas representam da esquerda para a direita, respectivamente: marcador de peso molecular (MM), pele (P), músculo (MU), pulmão (PU) e tumor (T).....26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Listagem dos anticorpos primários utilizados para a técnica de WB.....	20
Tabela 2. Listagem dos anticorpos primários utilizados para a técnica de IHQ.	21
Tabela 3. Valores absolutos e em percentual (entre parênteses) de células que expressaram o anticorpo RAR- β na imunohistoquímica, comparando as lesões BD, MD e CA.....	27
Tabela 4. Valores absolutos e em percentual (entre parênteses) de intensidade da imunomarcção nuclear para o anticorpo RAR- β na imunohistoquímica comparando as lesões BD, MD e CA.....	27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE A - Anexo	46
APÊNDICE B - Anexo	47

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor epitelial maligno de queratinócitos, que ocorre em órgãos revestidos por epitélio escamoso, afetando diferentes locais anatômicos (Yan, 2011). A pele é um dos principais órgãos acometidos em cães e gatos, sendo predispostos aqueles de pelagem clara e frequentemente expostos ao sol (Gross et al., 2005; Miller et al., 2013). Inicialmente, as lesões podem surgir como ceratose actínica (CA), que é uma lesão pré-neoplásica decorrente da exposição continuada aos raios UV (Paterson, 2008). Em um estudo brasileiro, o CCE representou 7,5% dos tumores cutâneos em cães, sendo o segundo mais frequente na espécie (Meirelles et al., 2010). Em outro estudo, representou 15,48%, sendo a neoplasia cutânea mais frequente em cães (Fernandes et al., 2015).

Geralmente, é uma neoplasia localmente invasiva, com baixo potencial metastático, podendo ser observada metástase em fases avançadas da doença (Gross et al., 2005). Os gânglios linfáticos regionais e o pulmão são os locais mais comuns para o desenvolvimento de metástases (Withrow & Macewen, 2007). Independentemente da localização do tumor, os CCE podem ser classificados em diferentes graus de diferenciação: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (Gross et al., 2005). Tem-se observado que quanto menor é o grau de diferenciação histológica do tumor, maior a probabilidade de ocorrência de metástases, e pior será o prognóstico (Rodaski & Werner, 2009).

Já foram descritas inúmeras modalidades terapêuticas para animais com CCE, como cirurgia, criocirurgia, radioterapia, terapia fotodinâmica e eletroquimioterapia (Lascelles et al., 2000; Goodfellow et al., 2006; Buchholz et al., 2007; Spugnini et al., 2016; Cunha et al., 2023). A ressecção cirúrgica com amplas margens de segurança representa a terapia de eleição (Lascelles et al., 2000; Thomson, 2007; Cunha et al., 2023). Entretanto, a cirurgia pode promover danos estéticos indesejáveis a depender da localização das lesões, como região abdominal, inguinal, membros, plano nasal e prepúcio (Thomson, 2007; Edgar et al., 2022; Cunha et al., 2023). Além disso, casos de lesões múltiplas ou extensas podem aumentar o risco de complicações pós-operatórias, prejudicando a capacidade funcional de membros, órgãos e outras estruturas adjacentes (Ruslander et al., 1997; Lascelles et al., 2000; Thomson, 2007).

Os retinóides são derivados naturais ou sintéticos da vitamina A, que exercem efeitos no crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (Klaassen & Braakhuis, 2002). Os ácidos retinóicos (AR) atuam reduzindo a expressão da proteína Bcl-2 e regulando positivamente as proteínas bax. Além disso, eles inibem o crescimento celular ao manter as células na fase G1 ou induzir a apoptose (Burg & Dummer, 2000). Em humanos, já foi descrito que os retinóides apresentaram efeitos antitumorais na leucemia promielocítica aguda (Santos et al., 2004) e em outros tumores, como o CCE da laringe (Cai et al., 2017), linfoma cutâneo (Zhang & Duvi, 2003), carcinomas de pulmão e tireoide e glioblastomas (Tsimberidou et al., 2004). Quando administrados em conjunto com o interferon- α 2A, os retinóides auxiliaram no tratamento do CCE humano da pele e do colo do útero, e carcinoma renal (Altucci et al., 2007).

Em cães e gatos, o papel dos receptores para ácido retinóico (RAR) na inibição do desenvolvimento de tumores ainda é pouco compreendido. Estudos demonstraram uma resposta satisfatória no uso do etretinato para o tratamento da CA em cães, sobretudo para aquelas lesões multifocais que não são facilmente tratadas por métodos locais de terapia (Marks et al., 1992). Ademais, os retinóides têm sido usados na dermatologia como terapia para casos de adenite sebácea e pilomatricomas benignos em cães (White et al., 1995; Toma et al., 2005). A isotretinoína obteve resultados satisfatórios no tratamento da furunculose actínica complicada por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a metilicina em um cão (Conceição et al., 2018). Os receptores para AR já foram identificados no linfoma cutâneo canino (Souza et al., 2010) e no mastocitoma em cães (Ohashi et al., 2006; Miyajima et al., 2006). Além disso, foi observada resposta satisfatória com o uso da isotretinoína, com obtenção de remissão clínica a longo prazo do linfoma cutâneo em dois cães (Lee et al., 2018).

Dentro deste contexto, objetivou-se com esse estudo avaliar a expressão dos RAR- α , RAR- β e RAR- γ na CA e no CCE em cães. Os retinóides e os fármacos que se ligam aos RARs podem ter um impacto no tratamento de cães com estas lesões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A CA é comumente diagnosticada em cães e gatos com pele clara, pouco pigmentada e com pouca cobertura pilosa que se expõe cronicamente à luz solar (Gross et al., 2005). Macroscopicamente, as lesões diagnosticadas com CA, inicialmente apresentam eritema, edema e descamação da pele exposta (Miller, et al., 2013). Na lesão crônica, evoluem para espessamento da pele, formação de comedões, bolhas hemorrágicas, alopecia, exsudação, crostas, ulceração, erosões, máculas, pápulas, nódulos e placas eritematosas (Miller et al., 2013). A CA pode se apresentar como lesões solitárias ou múltiplas e disseminadas (Gross et al., 2005). Além disso, as lesões de CA são ceratóticas, de espessura variável, mal delimitadas, com diâmetro igual ou inferior a 1 cm, grau variável de eritema e, às vezes, pigmentadas, podendo ter forma de corno cutâneo (Dreno et al., 2014).

Os principais achados histológicos são hiperplasia e displasia na epiderme, podendo ser leve à acentuada (Gross et al., 2005). Há hiperqueratose, paraceratose, acantose e displasia de queratinócitos (Meuten, 2002; Miller et al., 2013). Ainda, os queratinócitos, que são encontrados principalmente na camada basal e espinhosa, apresentam perda de polaridade, cariomegalia, cromatina evidente, nucléolos aumentados e proeminentes e figuras mitóticas de queratinócitos basais e suprabasais (Meuten, 2002; Gross et al., 2005). A hiperplasia e a displasia podem acometer as camadas periféricas dos folículos pilosos superficiais (Gross et al., 2005). Na CA, não há invasão através da membrana basal pelos queratinócitos displásicos e pode haver elastose solar (Gross et al., 2005).

A CA é um indicador da exposição crônica aos raios UV e da lesão inicial na maioria dos CECs cutâneos invasivos em humanos. Alguns autores afirmam que a CA é considerada um CEC *in situ* em humanos, devido à possível progressão para neoplasia invasiva e a semelhanças entre as alterações microscópicas e marcadores genéticos entre as doenças (Roewert-Huber et al., 2007; Deltondo & Helm, 2009). Entretanto, existem diferenças clínicas, epidemiológicas e moleculares que justificam a individualidade dos diagnósticos por outros autores (Cockerell, 2003).

A eficácia dos filtros solares na redução do desenvolvimento de CAs foi demonstrada por vários ensaios randomizados em humanos (Naylor et al., 1995; Darlington et al., 2003). Lesões avançadas requerem a utilização de criocirurgia ou remoção cirúrgica (Miller et al., 2013). Em humanos, foi descrito o efeito terapêutico

dos retinóides na CA (Hughes et al., 1988; Ianhez et al., 2013; Zhao et al., 2021). Em um estudo que avaliou a eficácia do etretinato para cães com lesões pré-neoplásicas induzidas pelo sol, cinco de 10 cães mostraram uma resposta parcial ou completa (Marks et al., 1992). Em outro estudo, foi observada resposta clínica em um cão com CCE com o uso do isotretinoína sistêmica associada ao aquecimento local com radiofrequência (Levine et al., 1990).

O CCE, também chamado de carcinoma epidermóide, carcinoma de células espinhosas ou carcinoma espinocelular, é uma lesão epitelial maligna onde as células tumorais mostram diferenciação escamosa variável (Weedon et al., 2006; Miller et al., 2013). A etiologia desta lesão está relacionada a predisposição genética e a radiação ultravioleta-B (UVB). Já foi associado em humanos a mutações no DNA (gene TP53, que codifica a proteína p53), radiação, queimaduras, exposição ao arsênico, imunossupressão, infecção por papiloma e lesões inflamatórias (Weedon et al., 2006).

O CCE cutâneo é uma neoplasia que não apresenta predisposição sexual. Nos cães, este tipo de carcinoma ocorre em média aos nove anos de idade, com uma faixa etária entre seis à dez anos de idade (Rodaski & Werner, 2009). Raças de pelo curto, com pelagem branca ou pele levemente pigmentada como Beagle, Dálmatas, Whippet, Bull terrier, têm maior predisposição para este tumor, principalmente se expostos ao sol (Miller et al., 2013). As áreas mais frequentemente acometidas pelo CCE são o tronco, orelhas, pálpebras, narina, lábios, escroto, região inguinal e região axilar (Rodaski & Werner, 2009). Além disso, o CCE é a neoplasia mais comum do dígito, enquanto o plano nasal é raramente afetado (Miller et al., 2013). Lesões em dígito tem prognóstico pior em animais, com sobrevida média de um a dois anos (Henry et al., 2005).

Macroscopicamente, a lesão pode apresentar aspecto proliferativo, semelhante à couve-flor ou erosivo que não cicatriza e recoberto por crostas, tendo tamanho variável. As lesões podem ser solitárias ou múltiplas (Rodaski & Werner, 2009). Os CCE podem apresentar comportamento localmente invasivo, levando a deformidades anatômicas com frequência e apresentam baixa capacidade metastática em casos iniciais (Gross et al., 2005). Entretanto, em casos tardios/avançados pode ocorrer lesões à distância em 17,7% dos casos caninos, sendo os linfonodos regionais, os locais mais acometidos (Grandi & Rondelli, 2016; Marconato et al., 2021).

Em gatos, foi relatado metástase em 22% dos casos também para o linfonodo regional (Lana et al., 1997).

O diagnóstico definitivo requer o estudo histopatológico, nos casos de anaplasia intensa, o exame imunohistoquímico (IHQ) pode auxiliar na identificação da origem epitelial do tumor (Gross et al., 2005). Histologicamente, o CCE bem diferenciado ocorre como lesões erosivas, semelhantes a placas, compreendendo ilhas e trabéculas de células escamosas que se originam da epiderme e invadem a derme (Meuten, 2002). A epiderme subjacente intacta geralmente apresenta paraqueratose e crostas, e ocasionalmente, hiperqueratose acentuada pode produzir um corno cutâneo (Weedon et al., 2006). Há uma progressão ordenada das células basais poliédricas, células basais não queratinizadas na periferia das estruturas epiteliais neoplásicas para células grandes, poligonais, queratinizadas nos centros (Gross et al., 2005). As células queratinizadas centrais têm abundante citoplasma eosinofílico e um grande núcleo vesicular e o citoplasma das células basalóides periféricas é escasso e anfófilo (Gross et al., 2005). A queratina laminada, ou pérolas córneas, estão presentes em tamanho e número variáveis (Weedon et al., 2006).

Ocasionalmente, pode haver infiltração ao longo das bainhas nervosas, a adventícia dos vasos sanguíneos e vasos linfáticos (Meuten, 2002). A presença de linfócitos perineural pode ser observada e foi relacionada a recorrência local após completa excisão cirúrgica (Gross et al., 2005). Frequentemente há um infiltrado de neutrófilos nas ilhas de epitélio escamoso neoplásico, enquanto plasmócitos e linfócitos são encontrados no estroma do tecido conjuntivo que circunda o tumor (Meuten, 2002). O CCE moderadamente diferenciado apresenta moderada queratinização, mas as pérolas e as pontes intercelulares são menos frequentes (Mauldin & Kennedy, 2015).

O sistema de classificação de tumores da Organização Mundial de Saúde (Weedon et al., 2006) utiliza o grau de anaplasia para realizar uma classificação histológica do grau de diferenciação celular nas seguintes categorias subjetivas:

- Bem diferenciado: ilhas e trabéculas de células escamosas que se originam da epiderme e invadem a derme. Há uma progressão ordenada das células basais poliédricas não queratinizadas na periferia das estruturas epiteliais neoplásicas para células grandes, poligonais, queratinizadas nos centros. Presença de pérolas córneas, paraceratose e/ou hiperkeratose.

- Moderadamente diferenciado: pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e moderada queratinização, mas as pérolas córneas e as pontes intercelulares são menos frequentes.
- Pouco diferenciado: Células imaturas com numerosas mitoses e mínima quantidade de queratina sem a formação das pérolas córneas.

Os fatores clínicos e histológicos que têm sido associados com maior recorrência local e metástases incluem o tamanho do tumor, profundidade de invasão, diferenciação histológica, localização anatômica, invasão perineural, o crescimento rápido e imunossupressão (Rinker et al., 2001).

A ressecção cirúrgica, quando realizada com amplas margens de segurança, é a principal modalidade de tratamento para o CCE, proporcionando maiores chances de cura (Thomson, 2007). Em estádios avançados, podem ser necessárias cirurgias extensas para alcançar margens adequadas, podendo levar a danos estéticos e funcionais (Schmidt et al., 2005). Além da cirurgia, a quimioterapia adjuvante deve ser empregada para promover remissões mais duradouras (Kuhnel & Kessler, 2014). Porém, o tratamento quimioterápico utilizado de forma isolada não tem sido suficiente para induzir remissões completas das lesões (Ferreira et al., 2009). Outras modalidades de tratamento incluem terapia fotodinâmica (Sajisevi et al., 2015), criocirurgia (Lucas & Larsson, 2006), radioterapia (Goodfellow et al., 2006; Grier & Mayer, 2007) e eletroquimioterapia (Tozon et al., 2016; Cunha et al., 2023).

Os retinóides são derivados naturais ou sintéticos da vitamina A e exercem efeitos no crescimento e diferenciação de diversos tipos celulares (Klaassen & Braakhuis, 2002). Esses efeitos ocorrem por meio da interação com receptores nucleares retinóides específicos que fazem parte da superfamília de receptores nucleares de esteroides (Altucci et al., 2007). Os receptores retinóides funcionam como fatores de transcrição dependentes de ligantes, e a ligação ao retinóide e a ativação do receptor são seguidas pela transcrição de genes responsivos (Altucci et al., 2007). Os receptores de retinóide são divididos em duas famílias: os receptores de ácido retinóico (RARs) e os receptores retinóides X (RXRs, também chamados de rexinóides). Cada família possui três subtipos de receptores (α , β e γ), com múltiplas isoformas e genes específicos que codificam cada um deles (Lippman & Lotan, 2000; Fields et al., 2007).

O RAR- β é induzido pelo AR sendo o receptor predominante que medeia os efeitos inibitórios do AR na proliferação celular (Seewaldt et al., 1995; Faria et al.,

1999; Altucci et al., 2007). Já foi descrito que o RAR- β estimula a indução de inibidores do ciclo celular, como p21^{CIP1} e p27^{KIP1} (Li et al., 2004; Suzui et al., 2004). Além disso, o RAR- β é conhecido por seus efeitos supressores de tumor em células epiteliais (Bushue & Wan, 2010; Tang & Gudas, 2011; Freemantle et al., 2003). Em um estudo, a perda da expressão de RAR- β induzida pelo AR foi considerada um passo crucial no desenvolvimento da resistência ao AR na carcinogênese mamária em humanos (Sirchia, 2002).

Como os efeitos terapêuticos e adversos variam dependendo da classe e subtipo de receptor ligado, uma variedade de novos retinóides sintéticos com especificidade da isoforma está sendo investigada. Estudos demonstraram que os retinóides inibiram lesões pré-malignas, como leucoplasia oral, displasia cervical e xeroderma pigmentoso em humanos (Marks et al., 1992; Klaassen & Braakhuis, 2002; Altucci et al., 2007). Em humanos, os retinóides têm sido usados com sucesso como agente único no tratamento da leucemia promielocítica aguda e no linfoma cutâneo (Santos et al., 2004; Zhang & Duvi, 2003). Quando administrados em conjunto com o interferon- α 2A, os retinóides auxiliaram no tratamento do CCE humano da pele e do colo do útero, e carcinoma renal (Altucci et al., 2007). Acitretina oral é recomendada como quimioprevenção do CCE em pacientes humanos de alto risco (Bath-Hextall et al., 2007). Em pacientes com psoríase tratados com fototerapia psoraleno-UVA, o uso sistêmico de retinóides reduziu o risco de CEC (Nijsten & Popa, 2003).

Em cães, poucos estudos demonstraram os efeitos dos retinóides em neoplasias cutâneas. Em um estudo, 14 cães com linfoma cutâneo foram tratados com isotretinoína ou etretinato, com taxa de resposta clínica relatada de 42% (White et al., 1993). A eficácia clínica da isotretinoína combinada com IFN- α em dois cães com linfoma cutâneo epiteliotrópico foi relatada (Lee et al., 2018). Resultados preliminares sugeriram que o etretinato pôde proporcionar eficácia terapêutica na CA em cães (Marks et al., 1992). Além disso, os retinóides naturais (ATRA e 9-cis-RA) induziram a diferenciação, inibição do crescimento e apoptose em células de osteossarcoma canino (Hong et al., 2000). Ainda, linhagens de células de mastocitoma canino expressaram receptores de retinóide (Ohashi et al., 2006; Miyajima et al., 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comissão de ética

O delineamento da pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV e foi aprovado por essa comissão, sob número de processo 62/2021. As Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do DVT/UFV foram seguidas rigorosamente. Não foram utilizados animais vivos na presente pesquisa. Parte das amostras foram provenientes do tecido de um cadáver de cão, doado para a presente pesquisa. Foi utilizado tecido tumoral retirado cirurgicamente de um cão diagnosticado com CCE, conforme indicação médica terapêutica, sempre levando em consideração o melhor para o paciente. Além disso, foram utilizados blocos de parafina de lesões diagnosticadas como CA e CCE em cães do arquivo da Patologia. A pesquisa foi realizada no período de 01/10/2021 a 31/07/2023. O médico veterinário responsável pela execução dessas atividades, coleta e envio das amostras para exame e seu respectivo CRMV: Jéssica Miranda Cota, CRMV ES 2954.

3.2. Amostras

Foram selecionadas para este estudo, 26 lesões diagnosticadas de acordo com as características histológicas como CCE e CA em cães. Essas lesões foram selecionadas retrospectivamente de registros de biópsias cutâneas de cães (tumores benignos e malignos), encaminhadas ao setor de patologia no período de 2009 a 2021. Os espécimes cutâneos, enviados ao laboratório de patologia, foram coletados por biópsia (*punch*, incisional ou excisional), fixados em formalina 10%, processados de maneira habitual e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram realizados com espessura de 3 a 5 micrômetros e corados com hematoxilina e eosina (HE).

As lesões previamente diagnosticadas como CCE e CA, foram revisadas e o diagnóstico confirmado sob microscopia óptica de luz por um avaliador. Foram avaliados casos histopatológicos caninos classificados previamente como CCE bem

diferenciado (BD) (n=15), CCE moderadamente diferenciado (MD) (n=8) e CA (n=3), conforme classificação de Gross et al. (2005).

O cadáver de um cão que veio a óbito, foi doado para a presente pesquisa, para a coleta de amostras dos tecidos, pelos Setor de patologia do departamento de veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Vale ressaltar que esse animal não foi morto para essa pesquisa, e sim foram coletados fragmentos de tecido. A doação do cadáver foi realizada mediante a assinatura do termo disponível no Apêndice B. Foi utilizado material de pele, pulmão e músculo esquelético.

Para os receptores de retinóide, pele, pulmão e músculo esquelético foram usados como controles positivos para a realização das técnicas de WB e posteriormente, IHQ. Essa decisão foi baseada na expressão da proteína RAR α , β e γ em humanos, conforme disponibilizado no site www.proteinatlas.org.

3.3. Western Blotting

É controverso se os anticorpos comerciais (policlonal de coelho) anti-RAR α (PA5107012), β (PA581249) e γ (PA587426) [Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA] reconhecem corretamente o homólogo canino de RAR α , β e γ . Inicialmente, para a validação dos anticorpos anti-RAR α , β e γ no tecido canino, foi realizada a técnica de *Western Blotting* (WB). Foi necessário tecido fresco de uma lesão diagnosticada como CCE de cão. Para isso, foi utilizado material biológico de um cão naturalmente acometido por CCE, não havendo predileção por idade, sexo ou raça. Esse animal, portador da doença natural, foi submetido aos procedimentos pré-operatório, técnica cirurgia adequada ao tratamento e pós-operatório conforme a indicação médica. Importante ressaltar que a pesquisa envolveu a manipulação do tecido tumoral apenas quando completamente retirado do animal, para fins diagnósticos e sob indicação médica, não envolvendo a manipulação do paciente nesta pesquisa. Foi utilizado material de animal de casuística hospitalar, selecionado no Hospital Veterinário (setor de clínica médica de pequenos animais) da Universidade Federal de Viçosa. Apenas foi incluído no estudo o cão cujo responsável procurou os respectivos Serviços para diagnóstico e tratamento, aceitou e concordou com a participação na pesquisa, mediante assinatura do termo de autorização (Apêndice A).

Após a retirada do tumor de acordo com a indicação clínico-cirúrgica, o material foi encaminhado para o exame histopatológico, a fim de se confirmar o diagnóstico. Para a confirmação diagnóstica, parte dos fragmentos coletados foram fixados em formalina 10%, processados de maneira habitual, incluídos em parafina e corados em hematoxilina e eosina. Os casos foram examinados sob microscopia óptica de luz e avaliados histologicamente por um patologista. Parte do material foi selecionado para a realização do WB. Esta amostra foi lavada para a remoção do sangue, com solução salina tamponada com fosfato (PBS) ou solução NaCl 0,9%. Em seguida, o fragmento foi colocado em um criotubo e acondicionado em nitrogênio líquido (-196°C), onde foi mantido até o descongelamento para realizar o WB.

Para o WB, foi usado um lisado de células de CCE obtido das amostras como previamente descritas, através de biópsia cutânea/excisão cirúrgica de tecido fresco de cão. Além disso, para o controle positivo, foram utilizados tecidos caninos frescos, conforme descrito no item 3.5, que expressam o receptor, como pele, pulmão e músculo esquelético. Essa seleção foi realizada através do site www.proteinatlas.org.

Os extratos proteicos foram separados em gel desnaturante de poli(acrilamida). O gel de separação foi constituído de 8 % de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 0,8/30% (p/v); Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 10% (p/v); 10% de persulfato de amônia (PSA) (p/v) e 0,05% (v/v) de TEMED. O gel de concentração foi constituído de 3,9% (v/v) de uma solução de: acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v); Tris-HCl 1,0 M pH 6,8; SDS 10% (p/v); 10% de persulfato de amônia (PSA) (p/v) e TEMED 0,05% (v/v). Aproximadamente 30 a 40 µg de proteínas foram utilizadas em cada corrida eletroforética. As amostras foram adicionadas ao tampão de amostra desnaturante para SDS-PAGE 5x concentrado (0,313M de Tris-HCl pH 6,8; 10% de SDS; 0,05% de Azul de Bromofenol; 10% de DTT; 50% de glicerol) e, em seguida aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi desenvolvida verticalmente com o tampão de eletroforese TRIS - Glicina (0,3% Tris-HCl; 1,2% de glicina e 0,1% de SDS) a 120 volts durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos, até que o tampão da amostra atingiu o final do gel.

Ao término da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) pelo sistema de

transferência semiseco (BioRad), por 90 minutos. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (20 mM Tris e 200 mM NaCl, pH7,4 – TBS) contendo 0,5% Tween-20 (Sigma) (TBS-T) por 1 hora e depois incubadas por 16h a 4°C com o anticorpo primário diluído em TBS-T com 5% de leite desnatado. Os anticorpos que foram utilizados estão listados na tabela a seguir:

Tabela 1. Listagem dos anticorpos primários utilizados para a técnica de WB.

Anticorpo	Laboratório	Diluição
RAR GAMMA-2 policlonal	ThermoFisher	1:500
RARA policlonal	ThermoFisher	1:500
RARB policlonal	ThermoFisher	1:500

As membranas foram lavadas três vezes de cinco minutos com TBS-T, e então, incubadas por uma hora com anticorpo secundário anti o primário, a temperatura ambiente. O anticorpo secundário anti igG de coelho produzido em cabra (31460 - ThermoFisher) foi conjugado a peroxidase (1:1000). As bandas foram reveladas em scanner de quimioluminescência C-digit da LICOR®.

3.4. Imunohistoquímica (IHQ)

Após a validação dos anticorpos pela técnica de WB no tecido canino, as lesões selecionadas foram submetidas à técnica de IHQ para verificar a expressão dos receptores para os anticorpos policlonais anti-RAR α (PA5107012), β (PA581249) e γ (PA587426) [Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA]. Os blocos de parafina foram cortados com três micrômetros de espessura e distendidos sobre lâminas carregadas eletricamente (Starfrost®). A desparafinização dos cortes foi realizada com xilol e álcool etílico. A técnica seguiu o protocolo para o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase estabelecido por Hsu e colaboradores (1981). O material seguiu para o processo de bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos de 15 minutos cada com peróxido de hidrogênio. O peróxido foi lavado em

água corrente e as lâminas foram posteriormente mergulhadas em solução tampão com pH 7,0 (PSB - solução salina tamponada com fosfato).

A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão citrato em pH 6.0 na panela de pressão (Pascal®), por cinco minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Após mais cinco minutos em solução PSB, cada lâmina foi seguida do uso do anticorpo específico (RAR α , β e γ). As lâminas foram então mantidas em câmara úmida por 12 horas (*over night*) a 8°C. Nova lavagem foi feita com PSB previamente a aplicação do anticorpo secundário anti-coelho igG (31460) – [Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA] e, finalmente, com complexo estreptavidina-peroxidase (StreptABD – Streptavidina Biotina Complexo). A revelação foi obtida com solução contendo diaminobenzidina e a contracoloração com Hematoxilina de Harris (Hsu et al., 1981). Foram feitos banhos em álcool e xilol para desidratação.

Foram utilizadas nas reações, os anticorpos policlonais nas titulações descritas na tabela 2. Controles positivos e negativos, conforme descrito no item 3.5, foram processados junto com a amostra da pesquisa, para assegurar os resultados confiáveis da técnica de IHQ. O sistema de polímero com anticorpo secundário ligado a peroxidase (EnVision, DakoCytomation®) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. O complexo foi revelado com o uso do 3,3' diaminobenzidine tetrachloride - DAB (DakoCytomation®). A interpretação IHQ foi realizada sob microscopia de luz. Os tecidos caninos como pele, pulmão e músculo esquelético foram fixados com formalina, processados de maneira habitual e incluídos em parafina, para servir como controles positivos. Na IHQ foram utilizados peptídeos bloqueadores como controles negativos.

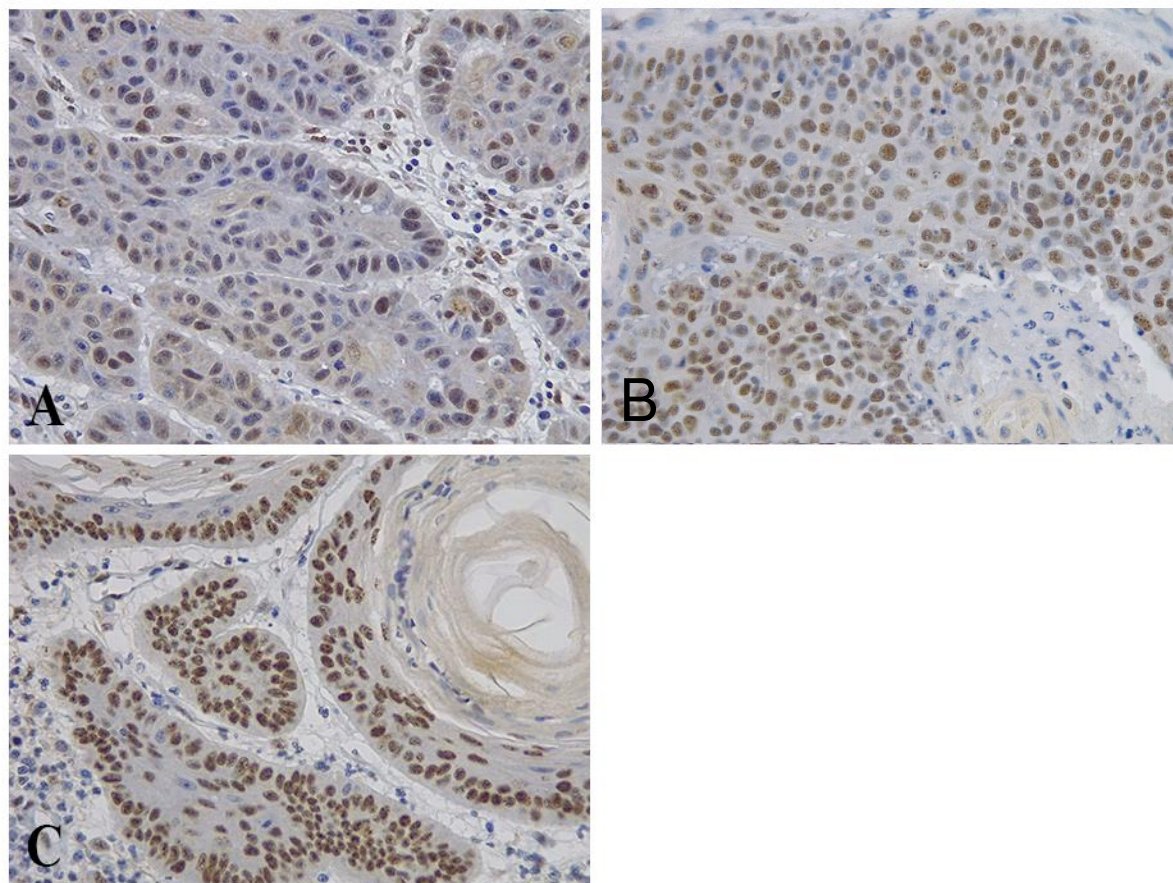
Tabela 2. Listagem dos anticorpos primários utilizados para a técnica de IHQ.

Anticorpo	Laboratório	Diluição
RAR GAMMA-2 policlonal	ThermoFisher	1:100
RARA policlonal	ThermoFisher	1:100
RARB policlonal	ThermoFisher	1:500

No estudo, foi comparada a imunomarcção do RAR α , β e γ e o seu padrão de coloração. Esta análise IHQ foi realizada no CCE BD e MD e na CA em cães. O método *Histo-score* modificado foi utilizado na avaliação da coloração IHQ, levando-se em consideração a porcentagem de positividade e a intensidade da coloração de forma semiquantitativa. Foram selecionadas as áreas tumorais mais homogeneamente coradas e com a maior intensidade de imunomarcção em cada lâmina.

A imunorreatividade foi pontuada por um índice de coloração baseado no percentual de células positivas, por uma estimativa semiquantitativa, como segue: tecido com coloração entre 0-24% (escore 0); tecido com coloração em 25-49% das células (escore 1); tecido com coloração em 50-74% das células (escore 2); tecido com coloração em $\geq 75\%$ das células (escore 3) (Perraud et al., 2011). No intervalo 0-24%, não havia nenhum caso de imunomarcção, não sendo considerado esse intervalo na análise. Além disso, foi analisado o escore de intensidade da imunomarcção nuclear, através de um método de escore histológico modificado em + (fraco), ++ (intermediário) e +++ (forte) (figura 1) (Allred et al., 1993; Allred et al., 1998). Cada lâmina foi avaliada independentemente por dois observadores (Kaiser et al., 2005).

Figura 1. Lesões diagnosticadas como CCE com intensidade da imunomarcção nuclear para o anticorpo RAR- β fraca (A), intermediário (B) e forte (C) (IHQ contracorado com hematoxilina 100 X).



Fonte: Cota (2024).

3.5. Análise estatística

Os dados obtidos pela análise histopatológica (tipo tumoral) e IHQ (marcação dos receptores para ácido retinóico β), foram submetidos à análise descritiva para se conhecer a natureza e orientar a abordagem das análises. Os escores para a expressão de imunomarcção foram relacionados às características histológicas das lesões. Estes dados foram tabulados no software Microsoft Excel 2023. Na análise estatística, para a comparação das proporções foi utilizado o teste do qui quadrado. O nível de significância adotado para todas as análises foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

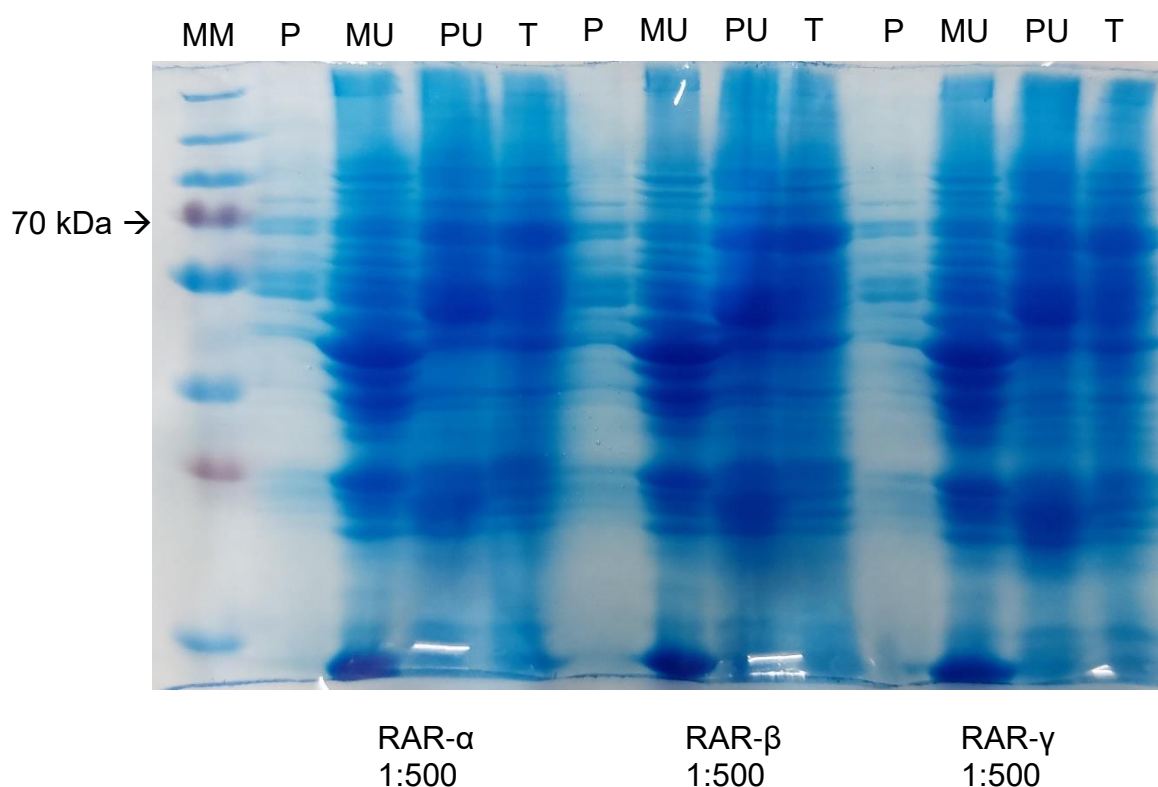
4.1. *Western blotting*

Os anticorpos reconheceram especificamente seus receptores presentes nos tecidos avaliados, que migraram de acordo com a massa molecular aproximadamente de 70 kDa. Um resultado preliminar à identificação com anticorpos é a avaliação da qualidade do extrato proteico corrido em SDS-PAGE e corado com Azul de *Commassie* para os tecidos avaliados (Figura 2). O padrão de bandeamento das amostras mostrou a integridade dos tecidos que não sofreram proteólise durante a extração e preparo da corrida.

Após a corrida eletroforética e transferência para a superfície da membrana de PVDF, as proteínas foram bloqueadas e incubadas com os anticorpos primários, lavadas e incubadas com o anticorpo secundário. Na presença do reagente de revelação (ECL Clarity-Biorad-Peroxidase + Luminol) foi possível escanear a membrana e capturar as imagens de quimiluminescência emitida pela enzima peroxidase conjugada ao anticorpo secundário. Na figura 3, foi observado que todas as três proteínas analisadas foram marcadas na amostra de tumor no tamanho adequado 70 kDa, contudo, a marcação mais intensa na amostra do tumor foi quando da utilização do anticorpo RAR- α , indicando este como um possível biomarcador.

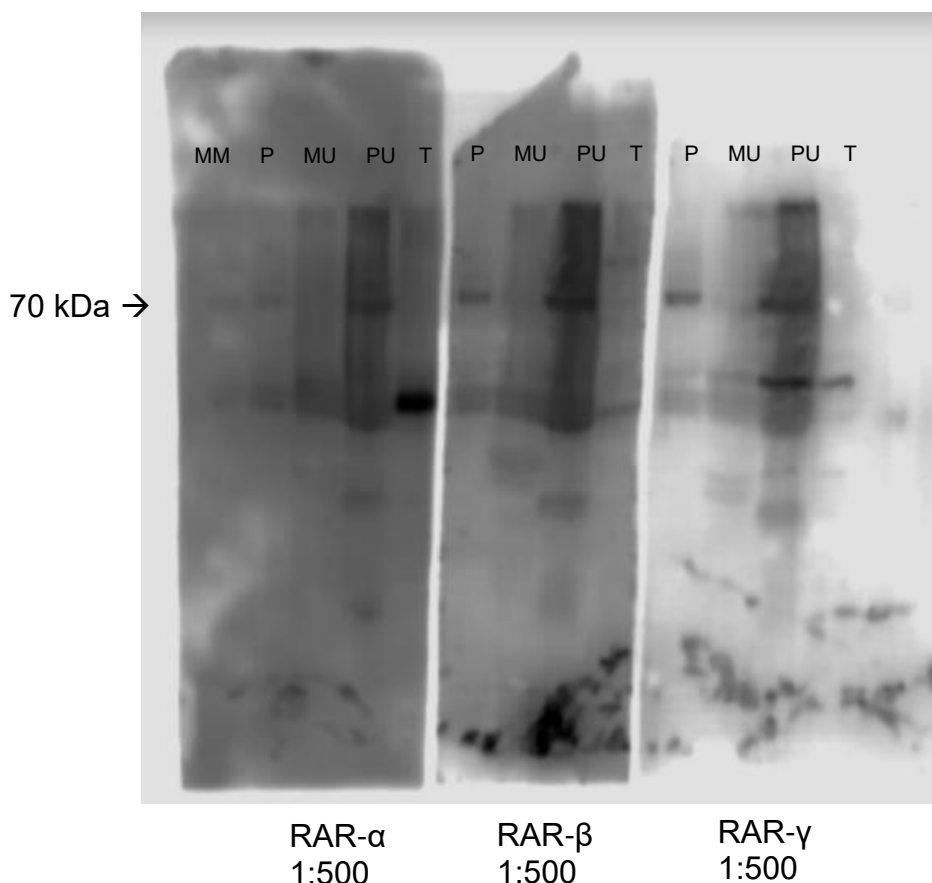
As amostras controle da pele e o músculo apresentaram marcação para os três anticorpos, sendo mais intensa quando da utilização do anticorpo RAR- γ e menos expressa com o anticorpo RAR- α . A amostra do pulmão apresentou marcação dos três anticorpos, sendo mais expressa com o anticorpo RAR- γ e RAR- β , podendo representar uma alta expressão no tecido normal canino.

Figura 2. SDS-PAGE (Gel de Eletroforese de Poliacrilamida com SDS) no tecido canino. Uma amostra de extrato proteico contendo 12 μ L foi aplicada em cada uma das canaletas. As colunas representam da esquerda para a direita, respectivamente: marcador de peso molecular (MM), pele (P), músculo (MU), pulmão (PU) e tumor (T). Foram três grupos de quatro bandas; cada grupo para cada anticorpo RAR α , β e γ , respectivamente. A visualização das bandas do gel de SDS Page 10% se deu pela coloração com *Blue Commassie*.



Fonte: Cota (2024).

Figura 3. *Western Blotting*. Em cada uma das canaletas foi adicionado 12 μ L da amostra de extrato proteico. As colunas representam da esquerda para a direita, respectivamente: marcador de peso molecular (MM), pele (P), músculo (MU), pulmão (PU) e tumor (T).



Fonte: Cota (2024).

4.2. Imunohistoquímica

Todas as 26 lesões diagnosticadas como CA ou CCE analisadas no estudo, expressaram o anticorpo RAR- β (PA581249) [Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA]. Foi observado diferença estatística no percentual de células que expressaram o RAR- β entre os grupos. Nos grupos MD e CA, a maioria das lesões apresentou mais que 75% de células marcadas para o anticorpo. Dentre os grupos analisados, as MD e CA, apresentaram maior percentual de células que expressaram no escore 3, quando comparadas ao grupo BD. As lesões classificadas como BD diferiram dos outros grupos, por apresentarem maior percentual de células classificadas como escore 1 de imunomarcção (tabela 3).

A intensidade da imunomarcção nuclear variou entre + (fraco), ++ (intermediário) e +++ (forte) entre os casos analisados. A maioria dos casos de carcinoma BD (12/15), MD (6/8) e CA (2/3) apresentaram imunomarcção nuclear forte para o anticorpo RAR- β , o que diferiu significativamente dentro de cada grupo. As lesões classificadas como CA apresentaram maior percentual de células com expressão intermediária, diferindo dos outros grupos (tabela 4).

Em todas as lesões, a marcação nuclear foi evidente e nenhum dos casos apresentou coloração restrita ao citoplasma. Além da coloração nuclear, foi observada ocasionalmente coloração citoplasmática leve. No estudo, os anticorpos RAR- α , RAR- γ e RAR- β foram expressos no tecido controle e tumoral através da técnica de WB, porém os anticorpos RAR- α e RAR- γ não apresentaram marcação nuclear evidente no controle positivo pela técnica de IHQ. Devido a isso, os anticorpos RAR- α e RAR- γ não foram testados nos casos.

Tabela 3. Valores absolutos e em percentual (entre parênteses) de células que expressaram o anticorpo RAR- β na imunohistoquímica, comparando as lesões BD, MD e CA.

Grupo	Escore 1 (25-49%)	Escore 2 (50-74%)	Escore 3 (\geq 75%)	P value
BD	4 (26,7) aA	5 (33,3) aA	6 (40,0) bA	0,2654
MD	1 (12,5) bC	2 (25,0) aB	5 (62,5) aA	<0,0001
CA	0 (0,0) cC	1 (33,3) aB	2 (66,7) aA	<0,0001
P value	<0,001	0,4714	0,0259	

*Porcentagem seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha, não se diferiram entre si pelo Teste de Qui-Quadrado ($P>0,05$).

Fonte: Cota (2024).

Tabela 4. Valores absolutos e em percentual (entre parênteses) de intensidade da imunomarcção nuclear para o anticorpo RAR- β na imunohistoquímica comparando as lesões BD, MD e CA.

Grupo	+	++	+++	P value
	(Fraco)	(Intermediário)	(Forte)	
BD	1 (6,7) aB	2 (13,3) bB	12 (80,0) aA	<0,0001
MD	1 (12,5) aB	1 (12,5) bB	6 (75,0) aA	<0,0001
CA	0,0 bC	1 (33,3) aB	2 (66,7) aA	<0,0001
P value	0,0022	0,0009	0,5430	

*Porcentagem seguidas das mesmas letras minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha, não se diferiram entre si pelo Teste de Qui-Quadrado ($P>0,05$).

Fonte: Cota (2024).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a expressão do RAR- β foi observada em todas as lesões diagnosticadas como CCE em cães na técnica de WB e na IHQ. Em todos os casos, a marcação nuclear foi evidente e ocasionalmente observou-se discreta coloração citoplasmática, assim como relatado em outro estudo (Souza et al., 2010). Os RAR- α e RAR- γ foram expressos no tecido canino controle e tumoral através da técnica de WB. Entretanto, quando realizada a técnica de IHQ, os mesmos receptores não apresentaram marcação nuclear evidente no tecido canino controle. Esse fato pode ser devido a marcação de proteínas ou elementos teciduais que não são a única proteína de interesse, sendo necessários mais estudos para se determinar a falta de marcação nuclear (Buchwalow et al., 2011; Ward et al., 2014; Miller, 2019).

De acordo com a literatura, antes de realizar a IHQ, o anticorpo deve ser validado através da técnica de WB (Schuster et al., 2012; Hewitt et al., 2014). A confirmação dos resultados de WB pode fornecer verificação biológica ou validação de um efeito experimental observado (Naegle et al., 2015; Casadevall et al., 2016; Pillai-Kastoori et al., 2020). Entretanto, a determinação da especificidade por WB não garante o mesmo resultado na IHQ, após o alvo ter sido submetido à fixação em formalina, incluídos em parafina e à recuperação do antígeno, podendo apresentar diferenças de epítomos após o processamento (Schuster et al., 2012; Pillai-Kastoori et al., 2020). Não há parâmetros na literatura ou um critério padronizado para a positividade dos receptores do ácido retinóico na CA e CCE canino, podendo gerar divergência nos resultados desta pesquisa. Devido a isso, os anticorpos RAR- α e RAR- γ não foram testados nos casos pela técnica de IHQ.

A forte expressão do RAR- α pela técnica de WB indica este receptor como um possível biomarcador. Na célula, o AR liga-se a dímeros de RAR- α e receptores retinóides para induzir a expressão de seus genes alvo, como o RAR- β , ativando a via clássica, induzindo a diferenciação celular e inibindo o crescimento celular (Connolly et al., 2013). A expressão do RAR- β pela técnica de IHQ, demonstrou a presença deste receptor nas lesões diagnosticadas como CA e CCE neste estudo. Os retinóides têm sido estudados na prevenção e tratamento de neoplasias, principalmente devido à sua capacidade de induzir a diferenciação celular e impedir

a proliferação celular (Connolly et al., 2013). Como exemplo, as expressões dos RAR e RXR foram associadas à resposta do carcinoma de tireóide aos retinóides e ao prognóstico no neuroblastoma em humanos (Cheung et al., 1998; Haugen et al., 2004; Klopper et al., 2004). Em um estudo, o uso de medicamentos com ligação ao receptor de retinóides, como o análogo sintético experimental RAR- β fenretinida, demonstrou ser mais eficaz e menos tóxico que a isotretinoína em humanos (Hail et al., 2006). A quimioprevenção visa reduzir o risco de desenvolvimento de novo CCE. Os retinóides orais acitretina e isotretinoína demonstraram ser eficazes na redução da incidência de novo CCE (Nijsten & Stern, 2003; Kadakia et al., 2012; Anforth et al., 2013; Nemer & Council, 2019).

No presente estudo, os CCE classificados como BD frequentemente apresentaram uma menor proporção de células que expressaram o anticorpo RAR- β na IHQ, quando comparado ao tipo MD. A maior expressão deste receptor em lesões com critérios de maior malignidade, pode estar relacionada a um marcador prognóstico ou possibilidade de melhor resposta ao tratamento com AR. Alguns autores descreveram que a expressão do gene RAR- β é complexa porque o mesmo gene é expresso em várias isoformas (β_1 , β_2 e β_4), que resultam de *splicing* alternativo e utilização de promotores alternativos (Chambon, 1996; Zelent et al., 1991; Nappgal et al., 1992).

A expressão diminuída do gene β_2 do RAR (RAR- β_2) no desenvolvimento de diferentes neoplasias em humanos resultou do silenciamento epigenético por metilação de ilhas citosina-fosfo-guanosina na região promotora do gene (Bean et al., 2005; Grote et al., 2005; Wang et al., 2003; Jeronimo et al., 2004). Além disso, o silenciamento e hipermetilação do RAR- β_2 foi associada à tumorigênese e à resistência aos retinóides durante o desenvolvimento do câncer em humanos (Ren et al., 2005). Em outro estudo, a indução de sua expressão pode suprimir a carcinogênese nos tumores esofágicos em humanos (Li et al., 2002). Em contrapartida, a expressão do RAR- β_4 foi aumentada no câncer esofágico em humanos e este aumento foi associado à redução da expressão do RAR- β_2 (Xu et al., 2005). Ainda é incerto se o RAR- β_4 é uma forma dominante negativa de RAR- β_2 ou um oncogene (Xu, 2007).

Neste estudo foi observado que as lesões diagnosticadas como CCE e as CA compartilharam a expressão do mesmo receptor, o RAR- β . Nas CA e nos CCE do tipo MD, a maioria das lesões apresentou mais que 75% de células marcadas

para o anticorpo, quando comparadas ao grupo BD. Esse achado levanta a hipótese que lesões inicialmente classificadas como CA possam evoluir para CCE moderadamente diferenciados no futuro. Alguns autores consideram a CA uma manifestação clínica mais precoce do CEC capaz de progredir para o CEC (Mortier et al. 2002; Stockfleth et al., 2008; Padilla et al., 2010).

Um estudo estimou que 0,25% a 1% das CAs em humanos progrediram para o CCE em um ano (Jeffes & Tang, 2000). Embora poucos CAs progridam para CEC, alguns estudos sugerem que aproximadamente 60% dos CECs cutâneos surgem de CAs pré-existentes (Criscione et al., 2009). Lesões que não progridem para CEC podem regredir ou persistir como CAs (Marks et al., 1986; Criscione et al., 2009). As taxas relatadas de regressão da CA geralmente variam entre 20 a 30 por cento ao ano, embora uma taxa de regressão de até 63 por cento ao ano tenha sido relatada em humanos (Werner et al., 2013).

Em outro estudo, a resposta imune cutânea estimulada pelo imiquimod, demonstrou desempenhar um papel importante na diminuição da taxa de transformação de CA em CEC invasivo (Lebwohl, 2003). De encontro a isso, análises moleculares revelaram que a CA e o CCE em humanos têm um perfil genético semelhante, incluindo alterações em p53, p16INK4a, MYC e no receptor do fator de crescimento epidérmico (Anderson et al., 2009; Padilla et al., 2010; Ratushny et al., 2012). Já foi demonstrado uma expressão gênica semelhante entre as lesões diagnosticadas em humanos, confirmando que a CA é uma lesão precursora do CCE (Padilla et al., 2010). A presença de alterações histopatológicas, associadas à apresentação clínica e às características imunoistoquímicas permitem sugerir que a CA e o CCE correspondem à mesma doença, mas em fases (Lebwohl, 2003; Rowert-huber et al., 2007). Entretanto, existem diferenças clínicas, epidemiológicas e moleculares que justificam a individualidade dos diagnósticos por outros autores (Cockerell, 2003).

Em uma pesquisa, foi demonstrado uma diminuição progressiva nas expressões de RAR- α , RAR- γ , RXR- α , RXR- β e RXR- γ na progressão carcinogênica da pele normal para CA e para CCE em humanos (Xu et al., 2001). A expressão de RAR- β foi ausente na pele normal e nas lesões (Xu et al., 2001). Em outro estudo, expressão de RAR- β nos tecidos não foi um indicador de progressão tumoral na neoplasia colorretal em humanos (Perraud et al., 2011). Foi descrito que a combinação de RAR- α positivo e RAR- β negativo apresentou um valor preditivo de

91% para lesões benignas da tireoide em humanos (Hoftijzer et al., 2009). Em outro estudo, a expressão de RAR- β correlacionou-se com um comportamento menos agressivo numa variedade de doenças malignas em humanos (Cheung et al., 1998; Khuri et al., 2000). Em sintonia, a perda de RAR- β tem sido associada a um comportamento mais agressivo e este receptor é agora considerado como tendo uma função supressora de tumor, embora mecanismos precisos para este efeito ainda não tenham sido elucidados (Xu, 2007).

Estudos demonstram que a expressão do RAR- β pode ser perdida no início da carcinogênese ou epigeneticamente silenciada em tumores sólidos em humanos e no processo de carcinogênese epitelial (Sirchia et al., 2000; Mongan & Gudas, 2007; Xu, 2007; Tang & Gudas, 2011). Em contraste com as mutações em RAR- α que causam leucemia promielocítica aguda, os RARs geralmente não sofrem mutação, nem fazem parte de proteínas de fusão em carcinomas (Mongan & Gudas, 2007). No entanto, a via de sinalização retinóide é frequentemente comprometida em células carcinomatosas, em relação ao tecido epitelial normal circundante. Esta perda frequente de responsividade retinóide em células tumorais é indesejável no tratamento com AR (Tang & Gudas, 2011).

Outros autores afirmam que a restauração da expressão de RAR- β reativa o controle de crescimento dependente de AR (Wan et al., 1999; Sirchia et al., 2002; Xu, 2007). A perda ou redução da expressão de RAR- β durante a carcinogênese foi frequentemente associada à resistência aos retinoides, o que sugere que o RAR- β pode mediar os efeitos da AR e atuar como supressor tumoral. No entanto, uma ressalva a essa sugestão é que os camundongos nulos RAR- β não apresentavam uma incidência maior de cânceres espontâneos (Mendelsohn et al., 1994).

A falta de expressão de RAR- α também pode contribuir para a perda da expressão de RAR- β . A parada do crescimento celular induzida por RAR- β e a apoptose são mediadas por RAR- α (Chambon, 1996). Em um estudo em camundongos, foi identificado que a perda da expressão do RAR- α estava envolvida no processo de progressão tumoral da pele normal, para CA e CCE induzida pela radiação ultravioleta (Zhang et al., 2021). Além disso, a ativação de RAR- α inibiu a proliferação e migração de células CCE em camundongos, demonstrando ser um potencial alvo terapêutico para o CCE (Zhang et al., 2021). Em contraste, a forte expressão do RAR- α foi associado a um pior prognóstico no CEC oral em humanos (Chakravarti et al., 2003).

Apesar de ser descrito na literatura a influência do RAR- α na progressão da CA e CCE, não foi possível comprovar essa associação neste estudo. Reforçamos que a falta de padronização do grau de expressão dos RARs e da utilização desses anticorpos pela técnica de IHQ no tecido canino, dificulta a realização de pesquisas e pode afetar a comparação de resultados. Estudos futuros, estabelecendo consensos de análise dos anticorpos para o RAR, poderão contribuir para uma melhor padronização e discussão dos dados na CA e CCE caninos, além de oferecer possíveis alvos terapêuticos nessa espécie.

A intensidade da imunomarcção nuclear para o anticorpo RAR- β variou nas lesões diagnosticadas como CA e CCE e a maioria dos casos apresentou forte expressão nuclear. Apesar dos mecanismos subjacentes não serem claros, existem explicações na literatura para o achado deste estudo. Autores demonstraram que a forte expressão do RAR- β foi associada a um pior prognóstico no câncer pulmonar em estágio inicial em humanos (Khuri et al., 2000). Em outro trabalho, os receptores RAR- β , RXR- α e RXR- γ foram frequentemente expressos em linfomas cutâneos em cães, utilizando a técnica de IHQ, sendo o RAR- β expresso em 87% dos casos (Souza et al., 2010). No epitélio normal adjacente, as células bem diferenciadas eram em sua maioria negativas (Souza et al., 2010).

Outra explicação possível para o resultado deste estudo, é que a via de sinalização retinóide possa estar alterada, de modo que o RAR- β_2 não consegue regular seus genes-alvo que desempenham um papel na supressão tumoral. Em um estudo, foi observada a perda de capacidade de resposta aos retinóides em células epiteliais brônquicas neoplásicas, apesar da expressão do RAR- β (Kim et al., 1995). A perda da função do RAR- β_2 pode ser causada por alterações no nível ou função do corepressor ou coativador (Moghal & Neel, 1995). Trabalhos demonstram que a diminuição na expressão do RAR- β ocorre porque o receptor é silenciado por hipermetilação nas regiões CpG (Sirchia et al., 2000; Sirchia et al., 2002; Jeronimo et al., 2004). As variáveis que podem afetar potencialmente as respostas dos retinóides são: absorção e metabolismo do AR, os níveis de expressão gênica dos RAR e dos coativadores e correpressores, a hipermetilação de CpGs em promotores específicos em células neoplásicas, e as atividades de outras vias de sinalização (Moise et al., 2007; Wang et al., 2008).

6. CONCLUSÕES

Conclui-se que este é o primeiro trabalho validando os anticorpos RAR α (PA5107012), β (PA581249) e γ (PA587426) [Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA] no tecido canino através da técnica de WB, promovendo perspectivas para novos estudos. Os achados desta pesquisa demonstram a presença do RAR- β na CA e CCE em cães. Ainda, que as CA compartilham o mesmo receptor RAR- β que lesões com critérios de maior malignidade, sugerindo que a CA possa progredir para o CCE moderadamente diferenciado. A detecção da expressão dos RAR pode justificar uma possível opção de tratamento para o uso de análogos de retinóides na CA e CCE em cães.

A intensidade da expressão do RAR- β não apresentou variação significativa entre os CEC e CA em cães, não sendo possível a determinação do impacto da IHQ como modalidade diagnóstica. As limitações do presente estudo incluem o fato de que a IHQ determina a presença do receptor no tecido e não detecta a atividade ou funcionalidade da proteína. Uma vez que a presença ou ausência de receptores retinóides específicos tem sido associada à resposta terapêutica, é necessário um estudo correlacionando o isotipo específico do receptor retinóide à resposta ao tratamento e prognóstico.

REFERÊNCIAS

ALLRED, D. C.; CLARK, G. M.; ELLEDGE, R.; FUQUA, S. A.; BROWN, R. W.; CHAMNESS, G. C.; OSBORNE, C. K.; MCGUIRE, W. L. Association of p53 protein expression with tumor cell proliferation rate and clinical outcome in node-negative breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 3, p. 200-206, Feb, 1993. Doi: 10.1093/jnci/85.3.200. PMID: 8423624.

ALLRED, D. C.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol**, v. 11, n. 2, p. 155–168, feb. 1998.

ALTUCCI, L.; LEIBOWITZ, M. D.; OGILVIE, K. M.; DE LERA, A. R.; GRONEMEYER, H. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 6, n. 10, p. 793-810, oct. 2007. DOI: 10.1038/nrd2397. PMID: 17906642.

ANDERSON, L.; SCHMIEDER, G. J.; WERSCHLER, W. P.; TSCHEN, E. H.; LING, M. R.; STOUGH, D. B.; KATSAMAS, J. Randomized, double-blind, double-dummy, vehicle-controlled study of ingenol mebutate gel 0.025% and 0.05% for actinic keratosis. **J Am Acad Dermatol**, v. 60, n. 6, p. 934-43, jun. 2009. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.01.008.

BEAN, G. R.; SCOTT, V.; YEE, L.; RATLIFF-DANIEL, B.; TROCH, M. M.; SEO, P.; BOWIE, M. L.; MARCOM, P. K.; SLADE, J.; KIMLER, B. F.; FABIAN, C. J.; ZALLES, C. M.; BROADWATER, G.; BAKER, J. C. JR.; WILKE, L. G.; SEEWALDT, V. L. Retinoic acid receptor-beta2 promoter methylation in random periareolar fine needle aspiration. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 4, p. 790-798, apr. 2005. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0580.

BUCHHOLZ, J.; WERGIN, M.; WALT, H.; GRÄFE, S.; BLEY, C. R.; KASER-HOTZ, B. Photodynamic therapy of feline cutaneous squamous cell carcinoma using a newly developed liposomal photosensitizer: preliminary results concerning drug safety and efficacy. **J Vet Intern Med**, v. 21, n. 4, p. 770-775, Jul-Aug. 2007. DOI: 10.1892/0891-6640(2007)21[770:ptofcs]2.0.co;2. PMID: 17708398.

BUCHWALOW, I.; SAMOILOVA, V.; BOECKER, W.; TIEMANN, M. Non-specific binding of antibodies in immunohistochemistry: fallacies and facts. **Sci Rep**, v. 1, n. 28, jul. 2011. DOI: 10.1038/srep00028.

BURG, G.; DUMMER, R. Historical perspective on the use of retinoids in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). **Clin Lymphoma**, v. 1, s. 1, p. 41–44, nov. 2000. DOI: 10.3816/clm.2000.s.008. PMID: 11707863.

BUSHUE, N.; WAN, Y. J. Retinoid pathway and cancer therapeutics. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 13, p. 1285–1298, oct. 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2010.07.003.

CAI, C. F.; LIU, C. S.; SHANG-GUAN, H. J.; et al. An oncogenic function of retinoic acid receptor- α in the development of laryngeal squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 14, n. 6, p. 7896-7902, dec. 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.7194. PMID: 28551544.

CASADEVALL, A.; ELLIS, L. M.; DAVIES, E. W.; MCFALL-NGAI, M.; FANG, F. C. A framework for improving the quality of research in the biological sciences. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 01256-16, aug. 2016. DOI: 10.1128/mBio.01256-16. PMID: 27578756. PMID: PMC4999552.

CHAKRAVARTI, N.; MATHUR, M.; BAHADUR, S.; SHUKLA, K. N.; RALHAN, R. Retinoic acid receptor-alpha as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 103, n. 4, p. 544-549, feb. 2003. DOI: 10.1002/ijc.10819.

CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J**, v. 10, n. 9, p. 940-954, jul. 1996. PMID: 8801176.

CHEUNG, B.; HOCKER, J. E.; SMITH, S. A.; NORRIS, M. D.; HABER, M.; MARSHALL, G. M. Favorable prognostic significance of high-level retinoic acid receptor beta expression in neuroblastoma mediated by effects on cell cycle regulation. **Oncogene**, v. 17, p. :751-759, 1998.

COCKERELL, C. J. Pathology and pathobiology of the actinic (solar) keratosis. **Br J Dermatol**, v. 149, Suppl 66, p. 34-36, 2003.

CONCEIÇÃO, L. G.; ARAÚJO, F. R.; LOURES, F. H.; ZANUNCIO, V. V. Isotretinoin in the treatment of actinic furunculosis complicated by meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a bull terrier dog. **Vet Dermatol**, v. 29, n. 6, p. 541-542, dec. 2018. DOI: 10.1111/vde.12692. PMID: 30318861.

CONNOLLY, R. M.; NGUYEN, N. K.; SUKUMAR, S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 7, p. 1651-1659, apr. 2013.

CRISCIONE, V. D.; WEINSTOCK, M. A.; NAYLOR, M. F.; LUQUE, C.; EIDE, M. J.; BINGHAM, S. F. actinic keratoses: natural history and risk of malignant transformation in the veterans affairs topical tretinoin chemoprevention trial. **Cancer**, v. 115, n. 11, p. 2523-2530, jun. 2009. DOI: 10.1002/cncr.24284. PMID: 19382202.

CUNHA, R. M. C.; LAVALLE, G. E.; NUNES, F. C.; DE OLIVEIRA, A. R.; DE LIMA SANTOS, R. DE ARAÚJO, R. B. Canine squamous cell carcinoma: Electrochemotherapy association with surgery and correlation with overall survival. **Vet Comp Oncol**, v. 21, n. 2, p. 240-254, jun. 2023.

DARLINGTON, S.; WILLIAMS, G.; NEALE, R.; FROST, C.; GREEN, A. A randomized controlled trial to assess sunscreen application and beta carotene supplementation in the prevention of solar keratoses. **Arch Dermatol**, v. 139, n. 4, p. 451-455, apr. 2003. DOI: 10.1001/archderm.139.4.451. PMID: 12707092.

DELTONDO, J. A.; HELM, K. F. Actinic keratosis: precancer, squamous cell carcinoma, or marker of field cancerization? **G Ital Dermatol Venereol**, v. 144, n. 4, p. 441-444, aug. 2009. PMID: 19755947.

DRÉNO, B.; AMICI, J. M.; BASSET-SEGUIN, N.; CRIBIER, B.; CLAUDEL, J. P.; RICHARD, M. A. Management of actinic keratosis: a practical report and treatment algorithm from AKTeam™ expert clinicians. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 28, n. 9, p. 1141-1149, sep. 2014. DOI: 10.1111/jdv.12434. Epub 2014 Mar 11. PMID: 24612407.

EDGAR, M. J.; QUINA, M. T.; TANO, C. A.; BLOCH, C. P. Outcome and complication rate of nasal planectomy reconstructed with direct mucocutaneous apposition. **Can Vet J**, v. 63, n. 4, p. 386-390, apr. 2022. PMID: 35368390; PMCID: PMC8922371.

FARIA, T. N.; MENDELSON, C.; CHAMBON, P.; GUDAS, L. J. The targeted disruption of both alleles of RAR-beta-2 in F9 embryonal carcinoma cells resulted in the loss of retinoic acid-associated growth arrest. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 26783-26788, sep. 1999. DOI: 10.1074/jbc.274.38.26783.

FERNANDES, C. C.; MEDEIROS, A. A.; MAGALHÃES, G. M.; SZABÓ, M. P. J.; QUEIROZ, R. P. de; SILVA, M. V. A. da; SOARES, N. P. Frequência de neoplasias cutâneas em cães atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia durante os anos 2000 a 2010. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 2, p. 541-548, fev. 2015. DOI 10.14393/BJ-v31n2a2015-22371.

FERREIRA, K. C. R. S.; OLIVEIRA, R. T.; GOMES, C.; FERNANDES, A. O.; CARDOSO, C. S.; GARCES, T. N. A.; FARAON, A.; OLIVEIRA, L. O. 5-Fluorouracil associado à cirurgia como terapêutica para o carcinoma de células escamosas em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 1, p. 89-92, 2009. DOI: 10.22456/1679-9216.16197.

FIELDS, A. L.; SOPRANO, D. R.; SOPRANO, K. J. Retinoids in biological control and cancer. **J Cell Biochem**, v. 102, n. 4, p. 886-898, nov. 2007. DOI: 10.1002/jcb.21530.

FREEMANTLE, S. J.; SPINELLA, M. J.; DMITROVSKY, E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. **Oncogene**, v. 22, p. 7305-7315, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206936.

GOODFELLOW, M.; HAYES, A.; MURPHY, S.; BREARLEY, M. A retrospective study of (90)Strontium plesiotherapy for feline squamous cell carcinoma of the nasal planum. **J Feline Med Surg**, v. 8, n. 3, p. 169-176, jun. 2006. DOI: 10.1016/j.jfms.2005.12.003.

GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. H. Neoplasias Cutâneas. In: **DALEK, C. R.; DE NARDI, A. B. Oncologia em Cães e Gatos**, 2ed., Rio de Janeiro: Roca, p. 343-346, 2016.

GRIER, C. K.; MAYER, M. N. Radiation therapy of canine nontonsillar squamous cell carcinoma. **Canadian Veterinary Journal**, v. 48, n. 11, p. 1189-1191, nov. 2007. PMID: 18050803. PMCID: PMC2034434.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. **Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and histopathologic diagnosis**. 2.ed. Blackwell: Oxford, p. 561-865, 2005.

GROTE, H. J.; SCHMIEMANN, V.; GEDDERT, H.; ROHR, U. P.; KAPPES, R.; GABBERT, H. E.; BÖCKING, A. Aberrant promoter methylation of p16(INK4a), RARB2 and SEMA3B in bronchial aspirates from patients with suspected lung cancer. **Int J Cancer**, v. 116, n. 5, p. 720-725, sep. 2005. DOI: 10.1002/ijc.21090.

HAIL, N. JR.; KIM, H. J.; LOTAN, R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 10, p. 1677-1694, oct. 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-9289-3. PMID: 16850162.

HAUGEN, B. R.; LARSON, L. L.; PUGAZHENTHI, U.; HAYS, W. R.; KLOPPER, J. P.; KRAMER, C. A.; SHARMA, V. Retinoic acid and retinoid Xreceptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 1, p. 272-280, 2004. DOI: 10.1210/jc.2003-030770.

HEWITT, S. M.; BASKIN, D. G.; FREVERT, C. W.; STAHL, W. L.; ROSA-MOLINAR, E. Controls for immunohistochemistry: the Histochemical Society's standards of practice for validation of immunohistochemical assays. **J Histochem Cytochem**, v. 62, n. 10, p. 693-697, oct. 2014. DOI: 10.1369/0022155414545224. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25023613. PMCID: PMC4212362.

HOFTIJZER, H. C.; LIU, Y. Y.; MORREAU, H.; van WEZEL, T.; PEREIRA, A. M.; CORSSMIT, E. P.; ROMIJN, J. A.; SMIT, J. W. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. **Eur J Endocrinol**, v. 160, n. 4, p. 631-638, apr. 2009. DOI: 10.1530/EJE-08-0812.

HONG, S. H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; KADOSAWA, T.; MATSUNAGA, S. Differentiation induction of canine osteosarcoma cell lines by retinoids. **Res Vet Sci**, v. 68, n. 1, p. 57-62, feb. 2000. DOI: 10.1053/rvsc.1999.0338. PMID: 10684759.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 4, p. 577-580, apr. 1981. DOI: 10.1177/29.4.6166661.

HUGHES, B. R.; MARKS, R.; PEARSE, A. D.; GASKELL, S. A. Clinical response and tissue effects of etretinate treatment of patients with solar keratosis and basal cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol**, v. 18, n. 3, p. 522-529, nov. 1988. DOI: 10.1016/s0190-9622(88)70075-4.

IANHEZ, M.; FLEURY, L. F. JR.; MIOT, H. A.; BAGATIN, E. Retinoids for prevention and treatment of actinic keratosis. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 4, p. 585-593, jul-

aug. 2013. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20131803. PMID: 24068130; PMCID: PMC3760934.

JEFFES, E. W. B.; TANG, E. H. Actinic Keratosis: current treatment options. **Am J Clin Dermatol**, v. 1, n. 3, p. 167–179. 2000. DOI: 10.2165/00128071-200001030-00004.

JERÓNIMO, C.; HENRIQUE, R.; HOQUE, M. O.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J.; FONSECA, D.; TEIXEIRA, M. R.; LOPES, C.; SIDRANSKY, D. Quantitative RARbeta2 hypermethylation: a promising prostate cancer marker. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 12, p. 4010-4014, jun. 2004. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0643.

KAISER, P. C.; KÖRNER, M.; KAPPELER, A.; AEBI, S. Retinoid receptors in ovarian cancer: expression and prognosis. **Ann Oncol**, v. 16, n. 9, p. 1477-1487, sep. 2005. DOI: 10.1093/annonc/mdi265. PMID: 16012182.

KHURI, F. R.; LOTAN, R.; KEMP, B. L.; LIPPMAN, S. M.; WU, H.; FENG, L. Retinoic acid receptor-beta as a prognostic indicator in stage I non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 15, p. 2798–2804, aug. 2000. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.15.2798.

KIM, Y. H.; DOHI, D. F.; HAN, G. R.; ZOU, C. P.; ORIDATE, N.; WALSH, G. L.; NESBITT, J. C.; XU, X. C.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Retinoid refractoriness occurs during lung carcinogenesis despite functional retinoid receptors. **Cancer Res**, v. 55, n. 23, p. 5603-5610, dec. 1995. PMID: 7585641.

KLAASSEN, I.; BRAAKHUIS, B. J. M. Anticancer activity and mechanism of action of retinoids in oral and pharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 38, n. 6, p. 532–542, sep. 2002. DOI: 10.1016/s1368-8375(01)00118-x. PMID: 12167430.

KLOPPER, J. P.; HAYS, W. R.; SHARMA, V.; BAUMBUSCH, M. A.; HERSHMAN, J. M.; HAUGEN, B. R. Retinoid X receptor- γ and peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression predicts thyroid carcinoma cell response to retinoid and thiazolidinedione treatment. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 8, p. 1011–1020, aug. 2004.

KUHNEL, S.; KESSLER, M. Prognosis of canine oral (gingival) squamous cell carcinoma after surgical therapy. A retrospective analysis in 40 patients. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, v. 42, n. 6, p. 359-366, 2014.

LANA, S. E.; OGILVIE, G. K.; WITHROW, S. J.; STRAW, R. C.; ROGERS, K. S. Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 33, n. 4, p. 329-332, jul-aug. 1997. DOI: 10.5326/15473317-33-4-329. PMID: 9204469.

LASCELLES, B. D.; PARRY, A. T.; STIDWORTHY, M. F.; DOBSON, J. M.; WHITE, R. A. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. **Veterinary Record**, v. 147, n. 17, p. 473–476, 2000. DOI: 10.1136/vr.147.17.473.

LEBWOHL, M. Actinic keratosis: epidemiology and progression to squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol**, v. 149, n. 66, p. 31–33, nov. 2003. DOI: 10.1046/j.0366-077x.2003.05621.x.

LEE, G. W.; SONG, S. B.; KANG, M. H.; PARK, H. M. Clinical response to isotretinoin and interferon- α of two dogs with cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a case report. **BMC Vet Res**, v. 14, n. 1, p. 382, dec. 2018. DOI: 10.1186/s12917-018-1710-y. PMID: 30514314; PMCID: PMC6278019.

LEVINE, N.; EARLE, M.; WILSON, S. Controlled localized heating and isotretinoin effects in canine squamous cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol**, v. 23, n. 1, p. 68-72, jul. 1990.

LI, M.; SONG, S.; LIPPMAN, S. M.; ZHANG, X. K.; LIU, X.; LOTAN, R.; XU, X. C. Induction of retinoic acid receptor-beta suppresses cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 3, p. 411–418, 2002. DOI: 10.1038/sj.onc.1205106.

LI, R.; FARIA, T. N.; BOEHM, M.; NABEL, E. G.; GUDAS, L. J. 2004. Retinoic acid causes cell growth arrest and an increase in p27 in F9 wild type but not in F9 retinoic acid receptor β 2 knockout cells. **Exp. Cell Res**, v. 294, n. 1, p. 290–300, 2004.

LIPPMAN, S. M.; LOTAN, R. Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents. **J Nutr**, v. 130, n. 2, p. 479-482, fev. 2000. DOI: 10.1093/jn/130.2.479S. PMID: 10721933.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E. Crioterapia na clínica veterinária: avaliação da praticabilidade e efetividade em carcinoma espinocelular de felinos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, p. 33-42, 2006.

MARCONATO, L.; MURGIA, D.; FINOTELLO, R.; MEIER, V.; MORELLO, E. M.; PISONI, L.; FOGLIA, A.; GUERRA, D.; CHALFON, C.; ARALLA, M.; MESTO, P.; ANNONI, M.; ALBANESE, F.; BETTINI, G.; SABATTINI, S. Clinical Features and Outcome of 79 Dogs With Digital Squamous Cell Carcinoma Undergoing Treatment: A SIONCOV Observational Study. **Front Vet Sci**, v. 30, n. 8, 645982, apr. 2021.

MARKS, R.; FOLEY, P.; GOODMAN, G.; HAGE, B. H.; SELWOOD, T. S. Spontaneous remission of solar keratoses: the case for conservative management. **Br J Dermatol**, v. 115, n. 6, p. 649-655, dec. 1986. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1986.tb06644.x. PMID: 3801305.

MARKS, S. L.; SONG, M. D.; STANNARD, A. A.; POWER, H.T. Clinical evaluation of etretinate for the treatment of canine solar-induced squamous cell carcinoma and preneoplastic lesions. **J Am Acad Dermatol**, v. 27, n. 1, p. 11-16, jul. 1992. DOI: 10.1016/0190-9622(92)70147-8. PMID: 1619058.

MAULDIN, E.; PETERS-KENNEDY, J. Integumentary System. In **Jubb's Domestic Animal Pathology, Kennedy and Palmer**, 6^a ed.; Elsevier: Amsterdã, Holanda, p. 509-736, 2015.

MEIRELLES, A. E. W. B.; OLIVEIRA E. C.; RODRIGUES, A. B.; COSTA, G.R.; SONNE, L.; TESSER, E. S.; DRIEMEIER, D. Prevalência de neoplasmas cutâneos em cães da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS: 1.017 casos (2002-2007). **Pesq. Vet. Bras**, v. 30, n. 11, p. 968-973, nov. 2010.

MENDELSON, C.; MARK, M.; DOLLÉ, P.; DIERICH, A.; GAUB, M. P.; KRUST, A.; LAMPRON, C.; CHAMBON, P. Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. **Dev Biol**, v. 166, n. 1, p. 246-258, nov. 1994. DOI: 10.1006/dbio.1994.1311.

MEUTEN, D. J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Ames, Iowa: Iowa State Press, p. 51-52, 2002.

MILLER, R.T. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry—important technical aspects that every pathologist should know. **Semin Diagn Pathol**, v. 36, n. 5, p. 312–335, 2019. DOI: 10.1053/j.semmp.2019.05.002.

MILLER, W.; GRIFFIN, C.; CAMPBELL, K. **Neoplastic and Non-Neoplastic Tumors**. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 7.ed. St. Louis: Elsevier, 948p., 2013.

MIYAJIMA, N.; WATANABE, M.; OHASHI, E.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; OGAWA, H.; SUGANO, S.; SASAKI, N. Relationship between retinoic acid receptor alpha gene expression and growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid on canine tumor cells. **J Vet Intern Med**, v. 20, n. 2, p. 348-354, mar-apr. 2006. DOI: 10.1892/0891-6640. PMID: 16594593.

MOGHAL, N.; NEEL, B. G. Evidence for impaired retinoic acid receptor-thyroid hormone receptor AF-2 cofactor activity in human lung cancer. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 3945-3959, jul. 1995. DOI: 10.1128/MCB.15.7.3945.

MOISE, A. R.; NOY, N.; PALCZEWSKI, K.; BLANER, W. S. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. **Biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 4449-4458, 2007. DOI: 10.1021/bi7003069.

MONGAN, N. P.; GUDAS, L. J. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation*, v. 75, n. 9, p. 853–870, nov. 2007. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2007.00206.x.

MORTIER, L.; MARCHETTI, P.; DELAPORTE, E.; MARTIN, D. E.; LASSALLE, E.; THOMAS, P.; PIETTE, F.; FORMSTECHE, P.; POLAKOWSKA, R.; DANZÉ, P. M. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. **Cancer Lett**, v. 176, n. 2, p. 205-214, feb. 2002. DOI: 10.1016/s0304-3835(01)00757-1.

NAEGLE, K.; GOUGH, N. R.; YAFFE, M. B. Criteria for biological reproducibility: what does "n" mean? **Sci Signal**, v. 7, n. 8, p. 371-377, apr. 2015. DOI: 10.1126/scisignal.aab1125. PMID: 25852186.

NAGPAL, S.; ZELENT, A.; CHAMBON, P. RAR-beta 4, a retinoic acid receptor isoform is generated from RAR-beta 2 by alternative splicing and usage of a CUG initiator codon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 7, p. 2718-2722, jul. 1992. DOI: 10.1073/pnas.89.7.2718.

NAYLOR, M. F.; BOYD, A.; SMITH, D. W.; CAMERON, G. S.; HUBBARD, D.; NELDNER, K. H. High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. **Arch Dermatol**, v. 131, n. 2, p. 170-175, feb. 1995. PMID: 7857113.

OHASHI, E.; MIYAJIMA, N.; NAKAGAWA, T.; TAKAHASHI, T.; KAGECHIKA, H.; MOCHIZUKI, M.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. **J Vet Med Sci**, v. 68, n. 8, p. 797-802, aug. 2006. DOI: 10.1292/jvms.68.797. PMID: 16953078.

PADILLA, R. S.; SEBASTIAN, S.; JIANG, Z.; NINDL, I.; LARSON, R. Gene expression patterns of normal human skin, actinic keratosis, and squamous cell carcinoma: a spectrum of disease progression. **Arch Dermatol**, v. 146, n. 3, p. 288-93, mar. 2010. DOI: 10.1001/archdermatol.2009.378.

PATERSON, S. **Manual of skin diseases of the dog and cat**. 2nd ed. Oxford: Blackwell, 356p., 2008.

PERRAUD, A.; NOUAILLE, M.; AKIL, H.; PETIT, D.; LABROUSSE, F.; JAUBERTEAU, M.; MATHONNET, M. Retinoid acid receptors in human colorectal cancer: An unexpected link with patient outcome. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 2, n. 3, p. 491-497, may. 2011. DOI: 10.3892/etm.2011.242.

PILLAI-KASTOORI, L.; HEATON, S.; SHIFLETT, S. D.; ROBERTS, A. C.; SOLACHE, A.; SCHUTZ-GESCHWENDER, A. R. Antibody validation for Western blot: By the user, for the user. **J Biol Chem**, v. 295, n. 4, p. 926-939, jan. 2020. DOI: 10.1074/jbc.RA119.010472. PMID: 31819006; PMCID: PMC6983856.

RATUSHNY, V.; GOBER, M. D.; HICK, R.; RIDKY, T. W.; SEYKORA, J. T. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. **J Clin Invest**, v. 122, n. 2, p. 464-72, feb. 2012. DOI: 10.1172/JCI57415.

REN, M.; POZZI, S.; BISTULFI, G.; SOMENZI, G.; ROSSETTI, S.; SACCHI, N. Impaired retinoic acid (RA) signal leads to RARbeta2 epigenetic silencing and RA resistance. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 23, p. 10591-10603, 2005. DOI: 10.1128/MCB.25.23.10591-10603.2005.

RINKER, M. H.; FENSKE, N. A.; SCALF, L. A.; GLASS, L. F. Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. **Cancer Control**, v. 8, n. 4, p. 354-363, jul-aug. 2001. DOI: 10.1177/107327480100800409. PMID: 11483889.

RODASKI, S.; WERNER, J. **Neoplasias de pele. In: DALECK, C.R.; NARDI, A.B.; RODASKI. Oncologia em cães e gatos.** São Paulo: Roca, p. 254-297, 2009.

ROEWERT-HUBER, J.; STOCKFLETH, E.; KERL, H. Pathology and pathobiology of actinic (solar) keratosis — an update. **Br j Dermatol**, v. 157, suppl. 2, p. 18–20, dec. 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08267.x. PMID: 18067626.

RUSLANDER, D.; KASER-HOTZ, B.; SARDINAS, J. C. Cutaneous squamous cell carcinoma in cats. **Compendium Continuing Education**, v. 19, n. 10, p. 1119–1129, 1997.

SAJISEVI, M.; RIGUAL, N. R.; BELLNIER, D. A.; SESHADRI, M. Image-guided Interstitial Photodynamic Therapy for Squamous Cell Carcinomas: Preclinical investigation. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery Medicine Pathology**, v. 27, n.2, p. 159-165, mar. 2015. DOI: 10.1016/j.ajoms.2013.12.003.

SANTOS, F. L. S.; Dore, A. I.; LIMA, A. S. G.; GARCIA, A. B.; ZAGO, M. A.; Rizzatti, E. G.; JUNIOR, J. E.; FALCÃO, R. P.; REGO, E. M. Características hematológicas e perfil de expressão de antígenos mielóides de pacientes com leukemia promielocítica aguda: análises de fatores prognósticos para o desenvolvimento da síndrome do ácido retinóico. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 50, n. 3, set. 2004. DOI: 10.1590/S0104-42302004000300036.

SCHMIDT, K.; BERTANI, C.; MARTANO, M.; MORELLO, E.; BURACCO, P. Reconstruction of the lower eyelid by third eyelid lateral advancement and local transposition cutaneous flap after "en bloc" resection of squamous cell carcinoma in 5 cats. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 1, p. 78-82, 2005. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2005.00014.x.

SCHUSTER, C.; MALINOWSKY, K.; LIEBMANN, S.; BERG, D.; WOLFF, C.; TRAN, K.; SCHOTT, C.; REU, S.; NEUMANN, J.; FABER, C.; HÖFLER, H.; KIRCHNER, T.; BECKER, K. F.; HLUBEK, F. Antibody validation by combining immunohistochemistry and protein extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. **Histopathology**, v. 60, n. 6, p. 37-50, may. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04184.x. PMID: 22393911.

SEEWALDT, V. L.; JOHNSON, B. S.; PARKER, M. B.; COLLINS, S. J.; SWIS-SHELM, K. Expression of retinoic acid β mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. **Cell Growth Differ**, v. 6, n. 9, p. 1077–1088, sep. 1995.

SIRCHIA, S. M.; FERGUSON, A. T.; SIRONI, E.; SUBRAMANYAN, S.; ORLANDI, R.; SUKUMAR, S.; SACCHI, N. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor beta2 promoter in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 19, n. 12, p. 1556–1563, mar. 2000. DOI: 10.1038/sj.onc.1203456.

SIRCHIA, S. M.; REN, M.; PILI, R.; SIRONI, E.; SOMENZI, G.; GHIDONI, R.; TOMA, S.; NICOLÒ, G.; SACCHI, N. Endogenous reactivation of the RAR β 2 tumor suppres-

sor gene epigenetically silenced in breast cancer. **Cancer Res**, v. 62, n. 9, p. 2455–2461, 2002.

SOUZA, C. H. DE M.; VALLI, V. E.; SELTING, K. A.; KIUPEL, M.; KITCHELL, B. E. Immunohistochemical detection of retinoid receptors in tumors from 30 dogs diagnosed with cutaneous lymphoma. **J Vet Intern Med**, v. 24, n. 5, p. 1112-1117, sep-oct. 2010. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2010.0571.x. PMID: 20707846.

SPUGNINI, E. P.; AZZARITO, T.; FAIS, S.; FANCIULLI, M.; BALDI, A. Electrochemotherapy as First Line Cancer Treatment: Experiences from Veterinary Medicine in Developing Novel Protocols. **Current Cancer Drug Targets**, v. 16, n. 1, p. 43- 52, 2016. DOI: 10.2174/156800961601151218155340.

STOCKFLETH, E.; FERRANDIZ, C.; GROB, J. J.; LEIGH, I.; PEHAMBERGER, H.; KERL, H. Development of a treatment algorithm for actinic keratoses: a European Consensus. **Eur J Dermatol**, v. 18, n. 6, p. 651-659, nov-dec. 2008. DOI: 10.1684/ejd.2008.0514.

SUZUI, M.; SHIMIZU, M.; MASUDA, M.; LIM, J. T.; YOSHIMI, N.; WEINSTEIN, I. B. Acyclic retinoid activates retinoic acid receptor β and induces transcriptional activation of p21CIP1 in HepG2 human hepatoma cells. **Mol. Cancer Ther**, v. 3, p. 309–316, 2004.

TANG, X. H.; GUDAS, L. J. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 345–364, 2011. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130303.

THOMSON, M. Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum in Cats and Dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 42-45, may. 2007. DOI: 10.1053/j.ctsap.2007.03.002. PMID: 17591288.

TOMA, S.; NOLI, C. Isotretinoin in the treatment of multiple benign pilomatrixomas in a mixed-breed dog. **Vet Dermatol**, v. 16, n. 5, p. 346–350, oct. 2005. PMID: 16238816. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2005.00470.x.

TOZON, N.; TRATAR, U. L.; ZNIDAR, K.; SERSA, G.; TEISSIE, J.; CEMAZAR, M. Operating procedures of the electrochemotherapy for treatment of tumor in dogs and cats. **Journal of Visualized Experiments**, v. 116, p. 54760, oct. 2016. DOI: 10.3791/54760.

TSIMBERIDOU, A. M.; GILES, F.; ROMAGUERA, J.; DUVIC, M.; KURZROCK, R. Activity of interferon-alpha and isotretinoin in patients with advanced, refractory lymphoid malignancies. **Cancer**, v. 100 n. 3, p. 574–580, feb. 2004. DOI: 10.1002/cncr.20009. PMID: 14745875.

WAN, H.; ORIDATE, N.; LOTAN, D.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Overexpression of retinoic acid receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma cells increases their sensitivity to retinoid-induced suppression of squamous differentiation by retinoids. **Cancer Res**, v. 59, n. 14, p. 3518-3526, jul. 1999. PMID: 10416619.

WANG, T.; MA, X.; KRAUSZ, K. W.; IDLE, J. R.; GONZALEZ, F. J. Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 324, n. 2, p. 674-684, feb. 2008. DOI: 10.1124/jpet.107.131045.

WANG, Y.; FANG, M. Z.; LIAO, J.; YANG, G. Y.; NIE, Y.; SONG, Y.; ET AL. Hypermethylation-associated inactivation of retinoic acid receptor beta in human esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 14, p. 5257–5263, nov. 2003.

WARD, J. M.; REHG, J. E. Rodent immunohistochemistry: pitfalls and troubleshooting. **Vet Pathol**, v. 51, n. 1, p. 88–101, jan. 2014. DOI: 10.1177/0300985813503571.

WEEDON, D.; MORGAN, M. D.; GROSS, C.; NAGORE, E.; YU, L. L.; SARASIN, A. Pathology and Genetics of Skin Tumors. **WHO International Classification of Tumours**. Lyon, France: IARC, 2006.

WERNER, R. N.; SAMMAIN, A.; ERDMANN, R.; HARTMANN, V.; STOCKFLETH, E.; NAST, A. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. **Br J Dermatol**, v. 169, n. 3, p. 502-518, sep. 2013. DOI: 10.1111/bjd.12420.

WHITE, S. D.; ROSYCHUK, R. A.; SCOTT, K. V.; HARGIS, A. M.; JONAS, L.; TRETTIEN, A. Sebaceous adenitis in dogs and results of treatment with isotretinoin and etretinate: 30 cases (1990-1994). **J Am Vet Med Assoc**, v. 207, n. 2, p. 197-200, jul. 1995. PMID: 7601715.

WHITE, S. D.; ROSYCHUK, R. A.; SCOTT, K. V.; TRETTIEN, A.; JONAS, L.; DENROLLE, P. Use of isotretinoin and etretinate for the treatment of benign cutaneous neoplasia and cutaneous lymphoma in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 202, n. 3, p. 387–391, feb. 1993. PMID: 8440627.

WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.167-191, 2007.

XU, X. C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. **Cancer Lett**, v. 253, n. 1, p. 14-24, aug. 2007. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.019.

XU, X. C.; LEE, J. J.; WU, T. T.; HOQUE, A.; AJANI, J. A.; LIPPMAN, S. M. Increased retinoic acid receptor-beta4 correlates in vivo with reduced retinoic acid receptor-beta2 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 4, p. 826–829, 2005. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0500.

XU, X. C.; WONG, W. Y.; GOLDBERG, L.; BAER, S. C.; WOLF, J. E.; RAMSDELL, W. M.; ALBERTS, D. S.; LIPPMAN, S. M.; LOTAN, R. Progressive decreases in

nuclear retinoid receptors during skin squamous carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 61, n. 11, p. 4306-4310, jun. 2001. PMID: 11389049.

YAN, W.; WISTUBA, I. I.; EMMERT-BUCK, M. R.; ERICKSON, H. S. Squamous cell carcinoma - similarities and differences among anatomical sites. **American Journal of Cancer Research**, v. 1, n. 3, p. 275-300, jan. 2011.

ZELENT, A.; MENDELSON, C.; KASTNER, P.; KRUST, A.; GARNIER, J. M.; RUFFENACH, F.; LEROY, P.; CHAMBON, P. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. **EMBO J**. v. 10, n. 1, p. 71-81, jan. 1991. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07922.x.

ZHANG, C.; DUVIC, M. Retinoids: Therapeutic applications and mechanisms of action in cutaneous t-cell lymphoma. **Derm Ther**, v. 16, n. 4, p. 322-330, 2003. PMID: 14686975. DOI: 10.1111/j.1396-0296.2003.01644.x.

ZHANG, G.; YAN, G.; FU, Z.; WU, Y.; WU, F.; ZHENG, Z.; FANG, S.; GAO, Y.; BAO, X.; LIU, Y.; WANG, X.; ZHU, S. Loss of retinoic acid receptor-related receptor alpha (Rora) promotes the progression of UV-induced cSCC. **Cell Death Dis**, v. 12, n. 3, p. 247, mar. 2021. DOI: 10.1038/s41419-021-03525-x.

ZHAO, Y.; ZHU, Y.; WANG, H.; JI, C. Case Report: Successful Treatment of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in Three Patients With a Combination of Acitretin and Clarithromycin. **Front Oncol**, v. 26, n. 11, p. 650974, feb. 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.650974.

APÊNDICE A - Anexo

Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Veterinária
 Avenida PH Rolfs, s/n – Campus Universitário 36571.000 – Viçosa – MG
 (31) 3899-2317 - dvt@ufv.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:
Número CEUA:
Pós-graduando:
Coordenador:

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a autorizar a participação de seu animal _____, espécie _____, registro nº _____, nesta pesquisa que tem como finalidade a investigação da expressão dos receptores de ácido retinóico no carcinoma de células escamosas e na ceratose actínica em cães. Ao participar deste estudo o (a) Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador realize a utilização do material biológico retirado cirurgicamente do meu animal para fins de ensino e pesquisa. O (a) Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá solicitar mais informações sobre a pesquisa através do e-mail jessica.cota@ufv.br ou telefone (27) 99884-2155 (pós-graduando) ou e-mail lissandro@ufv.br ou telefone (31) 3612-5621 (coordenador). Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a utilização do material biológico de seu animal nesta pesquisa. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Proprietário: _____
 RG/CPF: _____

Viçosa, ____ de _____ de 2021.

 Assinatura do Proprietário

 Assinatura do Pesquisador

APÊNDICE B - Anexo

Universidade Federal de Viçosa
Departamento de Veterinária
 Avenida PH Rolfs, s/n – Campus Universitário 36571.000 – Viçosa – MG
 (31) 3899-2317 - dvt@ufv.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE DOAÇÃO DE CORPO DE ANIMAL PARA FINS DE ENSINO E PESQUISA

Eu _____, inscrito no CPF
 _____, residente à
 _____, na cidade de
 _____, estado de _____, telefone
 _____, DOA, por este instrumento, de livre consentimento, o corpo
 do animal de minha responsabilidade _____, espécie _____, da
 raça _____, idade _____, pelagem _____.

- I- Declaro ter sido adequadamente esclarecido (a) acerca da destinação do corpo para fins de estudo e pesquisa.
- II- Declaro que os animais morreram por motivos médicos ou patológicos e os corpos, sob minha responsabilidade, serão doados.
- III- Declaro consentimento na doação do corpo do animal para o projeto de pesquisa intitulado “Receptores para ácido retinóico no carcinoma de células escamosas e ceratose actínica em cães”.

Considerações ou observações a serem prestadas pelo responsável pelo corpo:

_____, _____/____ de _____.

Assinatura do Responsável pelo Corpo do Animal (a)

Assinatura do Pesquisador/colaborador Responsável