

SIRLEY ADRIANA ORTIZ BEDOYA

**CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III NO ESTROMA DO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2015**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Ortiz Bedoya, Sirley Adriana, 1986-

O77c
2015 Caracterização de colágeno tipo I e III no estroma do
carcinoma de células escamosas cutâneas em cães / Sirley
Adriana Ortiz Bedoya. – Viçosa, MG, 2015.
x, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Medicina veterinária. 2. Cães. 3. Carcinoma de células
escamosas. 4. Colágeno. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

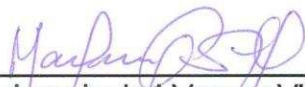
CDD 22. ed. 636.089698

SIRLEY ADRIANA ORTIZ BEDOYA

**CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III NO ESTROMA DO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES**

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

APROVADA: 20 de fevereiro de 2015.



Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Coorientadora)



Fabrício Luciani Valente
(Coorientador)



Gabriel Domingos Carvalho



Lissandro Gonçalves Conceição
(Orientador)

*A meus gatos...
Tommy Lee e
Tartanian Pricosirius.*

AGRADECIMENTOS

Não há palavras para agradecer a minha mãe pelos sacrifícios realizados em pro do bem-estar e sonhos dos seus filhos, a pesar que esses propósitos signifiquem distancia, saudade e longos tempos de ausência em casa. Agradeço também á meu irmão que a pesar das diferenças sempre esta nos momentos certos.

A meu pai por todas e cada uma das palavras de apoio durante estes dois anos nos que eu teria que ter ficado do teu lado cuidando de você.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao meu orientador Professor Lissandro pela oportunidade de fazer mestrado, por toda a ajuda, paciência e o tempo dedicado que contribuíram no meu aperfeiçoamento pessoal e profissional.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pelo apoio, a confiança em mim depositada, por me dar a oportunidade de olhar para novos horizontes e pelo carinho com o que sempre me acolheu.

Ao professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pelo apoio, os milhões de conselhos oferecidos, sua grande vontade de sempre brindar uma mão amiga, por me ajudar nos momentos que mais precisei, e pela sua amizade e confiança.

Á Fabricio todo meu agradecimento por ter sido base na consecução da finalização deste projeto, me ajudando sempre com a maior das vontades, e me transferindo sempre seus conhecimentos.

À Rosi, secretária da Pós-Graduação do DVT, pela dedicação incondicional, estando sempre disposta a ajudar com um sorriso no seu rosto.

Ao Laboratório de Histopatologia do departamento de Veterinária da UFV, O Laboratório de Associações Micorrízicas (BIOAGRO/UFV), Biologia e Controle de Helmintozoários e Vetores (BIOAGRO/UFV) e o Laboratório Biologia Molecular da UFV que permitiram a utilização de suas instalações e aparelhos, contribuindo na realização de minha fase experimental.

Ao Hospital Veterinário e laboratório clínico e toda sua equipe que fizeram de mim uma melhor profissional.

A todos os amigos que me acompanharam nesta caminhada, em especial a família Echavarría Londoño, Família Aguiar Albino, família Carrascal Gatti, Jose Cardona, Leda, Castaño, Margareth e Mariana Bretas, Rafael Blanco.

A todos aqueles que me ajudaram, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I- CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) EM CÃES – REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Resumo.....	3
Abstract.....	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Etiologia e Fatores de Risco.....	4
2.2. Manifestação clínica.....	6
2.3. Diagnóstico.....	7
2.3.1. Citologia.....	8
2.3.2. Histopatologia.....	8
2.3.3. Imunoistoquímica.....	12
2.4. Manejo clínico.....	12
2.4.1 Cirurgia.....	13
2.4.2. Criocirurgia.....	13
2.4.3. Radioterapia.....	15
2.4.4 Quimioterapia.....	16
2.4.5. Electroquimioterapia.....	17
2.5. Prognóstico.....	18
3. CONSIDERAÇÕES.....	19
REFERÊNCIAS.....	21

CAPÍTULO II- CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III NO ESTROMA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	27
1. INTRODUÇÃO.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3. RESULTADOS.....	33
Análise histológica.....	34
Distribuição dos CCEs cutaneos segundo a região do corpo.....	37
Caracterização de colágeno tipo I e III.....	38
Expressão de colágenos do tipo I e III utilizando três graus de diferenciação.....	39
Expressão de colágenos do tipo I e III utilizando dois graus de diferenciação.....	40
Expressão de colágenos segundo a localização do tumor.....	40
4. DISCUSSÃO.....	42
5. CONCLUSÃO.....	45
REFERENCIAS.....	46
ANEXOS.....	50

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1. Carcinoma de células escamosas cutâneo bem diferenciado em um cão..... 10

Figura 2. Carcinoma de células escamosas cutâneo pouco diferenciado em um cão..... 11

Capítulo II

Figura 3. Fotografia de pele normal mostrando a área de colágeno tipo I e III medida com o *software* Image J usando o *plug-in* Threshold Colour.....33

Figura 4. CCE cutâneo bem diferenciado.....35

Figura 5. A. CCE cutâneo pouco diferenciado.....36

Figura 6. Picrosirius Red/ sem polarização.....38

Figura 7. Fibras colágenas tipo I e III com Picrosirius red/ com polarização..39

Figura 8. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo o grau de diferenciação das amostras.....40

Figura 9. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo o grau de diferenciação das amostras.....41

Figura 10. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo a região do corpo acometida.....41

LISTA DE TABELAS**Capítulo I**

Tabela 1. Classificação TNM de tumores com origem na epiderme e derme de cães..... 19

Capítulo II

Tabela 2. Distribuição dos CCEs classificados em três graus de diferenciação segundo a região do corpo.....37

Tabela 3. Distribuição dos CCEs bem e pouco diferenciados segundo a região do corpo.....37

RESUMO

ORTIZ, Adriana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Caracterização de colágeno tipo I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição. Coorientadores: Marlene Isabel Vargas Vitoria e Fabrício Luciani Valente.

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia epitelial maligna que acomete cães e diversas outras espécies, incluindo a humana. O CCE afeta vários sítios anatômicos e pode desenvolver metástase. Este trabalho teve como objetivo proporcionar informações sobre fatores de risco, manifestação clínica, diagnóstico, tratamento e prognóstico, assim como a caracterização das fibras colágenas tipo I e III no estroma de CCE cutâneo em cães. Este estudo utilizou 44 amostras de pele incluídas em parafina, provenientes de dois serviços de diagnóstico em patologia veterinária, com prévio diagnóstico de CCE cutâneo. As amostras foram avaliadas histologicamente utilizando coloração de hematoxilina e eosina para classificação segundo o grau de diferenciação tumoral e, por Picrosirius Red sob luz polarizada para quantificação da expressão de colágenos tipos I e III. O colágeno tipo III mostrou maior expressão nos CCE cutâneos bem diferenciados, porém, isto só foi evidente quando as amostras foram classificadas em apenas dois graus de diferenciação: bem diferenciadas ou pouco diferenciadas. Considerando a distribuição dos tipos de colágeno segundo a região do corpo, o colágeno tipo I não apresentou diferença estatística entre cabeça, tronco e membros. Entretanto, para o colágeno do tipo III, a análise revelou que a quantidade expressa no tronco é significativamente maior que no membro. O papel do colágeno do tipo III nas neoplasias não está bem esclarecido e outros fatores além do grau de diferenciação celular podem estar envolvidos em sua expressão e determinar sua importância na biologia tumoral.

ABSTRACT

ORTIZ, Adriana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Characterization of collagen type I and III in the stroma of cutaneous squamous cell carcinoma in dogs.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição. Co-Advisers: Marlene Isabel Vargas Vilorio and Fabrício Luciani Valente.

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant epithelial tumor that affects dogs and several other species, including human. The SCC occurs in various anatomical sites and can develop metastasis. This study aimed to provide information about risk factors, clinical presentation, diagnosis, treatment and prognosis, as well as the characterization of collagen type I and III in SCC stroma in dogs. This study used 44 canine skin biopsies paraffin-embedded previously diagnosed with cutaneous SCC from two veterinary pathology diagnostic services. The samples were evaluated histologically with hematoxylin and eosin staining to evaluate the degree of cell differentiation, and with Sirius Red staining under polarized light to quantify the expression of collagen types I and III. Type III collagen expression was higher in well-differentiated SCC, however, it was only evident when samples were classified into only two degrees of differentiation: well differentiated or poorly differentiated. Considering the distribution of collagen types according to body region, type I collagen showed no statistical difference between head, trunk and limbs. However, for type III collagen, the analysis showed that the quantity expressed in the trunk is significantly larger than the member. The role of type III collagen in cancer is not very clear and factors other than cell differentiation degree may be involved in its expression and determine its importance in tumor biology.

INTRODUÇÃO GERAL

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor epitelial maligno que ocorre em órgãos normalmente cobertos por epitélio escamoso que exibe variado grau de diferenciação escamosa (WHO, 1998). Esta neoplasia acomete diferentes locais anatômicos (Yan *et al.*, 2011); nos cães e gatos a pele é um dos principais órgãos afetados (Torres-Vidales, 2003; Bravo *et al.*, 2010).

O grau de diferenciação histológica, e o local anatômico da lesão determinam o prognóstico do CCE cutâneo. Além disso, tumores grandes, pouco diferenciados, que mostram infiltração profunda na derme e tecido subcutâneo são associados a uma maior probabilidade de recidivas e metástases (Yanofsky *et al.*, 2011).

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, a história de tratamento, imunodepressão (Rinker *et al.*, 2001).

Estudos recentes na medicina humana têm mostrado que as interações das células tumorais com o microambiente tecidual, sugerem que a MEC desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do tumor (Koenig *et al.*, 2006; Lin e Yun, 2010). Provenzano *et al.* (2008) sugerem que uma alta densidade de fibras colágenas tipo I aumenta significativamente a iniciação, progressão e metástase do tumor. Este tipo de colágeno pode ser considerado como um biomarcador potencial em câncer de mama com metástase no pulmão (Kakkad *et al.*, 2012).

Embora os métodos de diagnóstico tenham avançado em medicina veterinária, são necessárias mais pesquisas para encontrar marcadores que permitam diagnósticos e avaliação prognóstica precisa, confiável e prática. Portanto, este trabalho tem por objetivo proporcionar informação sobre fatores de risco, manifestação clínica, diagnóstico, tratamento e prognóstico, assim como a caracterização das fibras colágenas tipo I e III no estroma de CCE cutâneo em cães.

CAPÍTULO I

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS (CCE) EM CÃES – REVISÃO DE LITERATURA

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES – REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia epitelial maligna na qual as células tumorais mostram variável diferenciação escamosa, podendo ser extremamente invasivo, mas de crescimento lento e com baixo potencial para metástases. Os fatores etiológicos que levam à formação de CCE cutâneo não são claros em todos os casos. É comum em cães idosos e imunodeprimidos, raças que apresentam pelo curto, com pelagem branca ou pele levemente pigmentada. O exame histopatológico é fundamental para confirmar o diagnóstico, definir o prognóstico e programar o tratamento adequado. O objetivo deste trabalho é proporcionar informações sobre o carcinoma de células escamosas cutâneo em cães.

Palavras-chave: caninos; histopatologia; neoplasia epitelial; prognóstico; tratamento.

ABSTRACT

The squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant epithelial neoplasm in which the tumor cells show variable squamous differentiation. It can be extremely invasive, but shows slow growth and low potential for metastasis. The etiological factors that lead to cutaneous SCC are not clear in all cases. It is common in older and immunocompromised dogs, short-haired breeds, with white fur or lightly pigmented skin. Histopathology is essential to confirm diagnosis, define prognosis and set the proper treatment. The aim of this study is to provide information on the cutaneous squamous cell carcinoma in dogs.

Keywords: canines; epithelial neoplasm; histopathology; prognosis; treatment.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um tumor epitelial maligno que ocorre em órgãos que normalmente são cobertos por epitélio escamoso, e exibem variado grau de diferenciação escamosa (WHO 1998). Esta neoplasia tem sido relatada em felinos, caninos, ovinos, caprinos, equinos, bovinos e humanos (Cardona *et al.*, 2013). Em cães é considerada uma das principais doenças neoplásicas da pele (Torres-Vidales, 2003; Bravo *et al.*, 2010).

Os fatores etiológicos que levam à formação de CCE não são claros em todos os casos. Várias alterações genéticas têm sido descritas na patogenia desta neoplasia, embora os mecanismos moleculares que contribuem para a iniciação e progressão do tumor sejam ainda pouco compreendidos (Yan *et al.*, 2011). Normalmente, é uma neoplasia localmente invasiva, mas que tarda em desenvolver metastase. 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 e Werner, 2009).

O objetivo desta revisão é oferecer informações claras, concisas e abrangentes sobre fatores de risco, manifestação clínica, diagnóstico, tratamento e prognóstico do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Etiologia e Fatores de Risco

Nos cães o CCE ocorre em média aos nove anos de idade, uma faixa etária entre seis a dez anos. Contudo, há relatos de CCE cutâneo diagnosticado em animais com dois e cinco meses de idade (Rodaski e Werner, 2009). Esta neoplasia não apresenta predisposição sexual. Raças em que o CCE aparece com mais frequência incluem o Keeshond, Schnauzer standard, Basset hound, e Collie (Miller *et al.*, 2013). Raças de pelo curto, com pelagem

branca ou pele levemente pigmentada como Beagle, Dálmatas, Whippet e Bull terrier, têm maior predisposição para este tumor, principalmente se passarem longas horas expostos ao sol (Rodaski e Werner, 2009).

O desenvolvimento desta neoplasia envolve várias etapas que implica no acúmulo de múltiplas alterações genéticas moduladas por predisposição genética, fatores de risco conhecidos, e outras influências ambientais desconhecidas (Yan, 2011). Exposição à radiação ultravioleta-B (UVB) é o fator etiológico mais importante (Weedon *et al.*, 2006). A radiação solar provoca reações fotoquímicas que ativam as vias inflamatórias, alteram o sistema imune e causam alterações do DNA, incluindo dímeros de pirimidina durante a replicação do DNA podendo levar a mutações no gene supressor de tumor p53, também conhecido como “guardião do genoma” (Weedon *et al.*, 2006).

Etiologias virais têm sido ligadas a certos CCE em humanos. O vírus do papiloma humano (HPV) pode estar envolvido no processo da carcinogênese na pele, como um cofator com a radiação UV (Webb *et al.*, 2009; Yan, 2011.). A infecção pelo HPV tipo 16 está associada a um número significativo de CCE de cabeça e pescoço em humanos, particularmente na orofaringe mesmo em pacientes que não se enquadram nos grupos de risco de consumo de tabaco e álcool (Li e Sturgis, 2006).

Em caninos, existem estudos como o realizado por Waropastrakul e colaboradores (2012) que encontraram DNA do papilomavírus canino (PVC) em um entre vinte de CCEs cutâneos examinados. Resultados similares foram obtidos por Zaugg e colaboradores (2005), que, ao analisar a presença de DNA do papiloma bucal canino em vinte e quatro CCE cutâneos, não encontraram nenhum caso positivo. Os resultados destes trabalhos sugerem que o papilomavírus não parece ser uma causa importante de CCE cutâneo em cães, entretanto o DNA de papilomavírus foi detectado em aproximadamente 20% dos cães e gatos com CCE *in situ* e das mucosas. Embora, atualmente não há provas suficientes para determinar o papel do vírus no desenvolvimento desta neoplasia em cães, o significado desta associação ainda deve ser determinado (Zaugg *et al.*, 2005; Waropastrakul *et al.*, 2012).

Também sugere-se que o PV poderia ser uma causa significativa de CCE em cães imunodeprimidos (Goldschmidt *et al.*, 2006). Nos humanos, os PV são bem reconhecidos por causar esta neoplasia cutânea em pessoas

imunodeprimidas. A infecção por PV foi relatada como causa para o desenvolvimento CCE em um grupo de cães com imunodeficiência combinada grave ligada ao cromossomo X. Além disso, antígenos de PV foram demonstrados em vários hamartomas cutâneos e CCE em um cão que tinha sido tratado com drogas imunossupressoras (Waropastrakul *et al.*, 2012).

Em cães, o CCE tem sido associado a cicatrizes de queimaduras, cistos foliculares múltiplos, inflamação crônica ou processos inflamatórios que incluem otites externas e lúpus eritematoso discoide. Outras condições, tais como pêfigo eritematoso e vitiligo, em que há despigmentação podem resultar em aumento da susceptibilidade para o dano actínico e predispor ao desenvolvimento de CCE (Miller *et al.*, 2013). No entanto, outros fatores etiológicos podem estar envolvidos, destacando-se a terapia de radiação, queimaduras anteriores, exposição ao arsênico e substâncias cancerígenas industriais (Weedon *et al.*, 2006).

2.2. Manifestação clínica

A localização anatômica das lesões cutâneas está relacionada com a quantidade de luz solar que atinge a pele (Guedes *et al.*, 1998). Nos cães pode acometer qualquer parte da pele, porém a maioria das lesões localiza-se na região da cabeça, abdômen, membros e períneo (Goldschmidt e Hendrick, 2002, Gross *et al.*, 2005; Wobeser *et al.*, 2007).

Ao exame macroscópico, observa-se eritema, edema e descamação, seguidos pelo desenvolvimento de crostas e posterior ulceração (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Os tumores podem ser exofíticos ou erosivos. Os exofíticos possuem aspecto papilar ou de couve-flor, de tamanho variável, e geralmente apresentam ulcerações na superfície e sangram com facilidade. Os erosivos caracterizam-se inicialmente por úlceras rasas cobertas com crostas, destrutivos que se aprofundam lentamente no tecido (Pulley e Stannard, 1990).

As lesões podem ser solitárias ou múltiplas, não obstante normalmente são solitárias, exceto quando os tumores se encontram associados a lesões solares (Rodaski e Werner, 2009). O aspecto da lesão pode mudar ao longo do

tempo; as lesões podem ser ligeiramente elevadas, com base ampla, e à medida que o tumor torna-se invasivo na derme, a lesão tende a ser mais firme e proliferativa (Webb *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2013).

A neoplasia pode estar presente por meses ou anos e, em geral, a história clínica está associada à presença de ferimento que não cicatriza. São comuns desconforto e prurido constante da lesão que tende a ulcerar e frequentemente complicam-se com infecções bacterianas secundárias (Goldschmidt e Hendrick, 2002) e miíases (Riet-Correa e Schild, 1995), o que resulta em exsudato purulento na superfície da massa tumoral (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Nos casos em que a neoplasia envolve as pálpebras e a região periocular, observam-se frequentemente blefaroespasma e secreção ocular (Guérios *et al.*, 2003). Comumente, o tumor é diagnosticado erroneamente como lesões inflamatórias ou traumáticas e terapias como antibióticos e corticosteroides muitas vezes são instituídas antes do diagnóstico correto (Webb *et al.*, 2009).

O CCE é extremamente invasivo, mas de crescimento lento e com baixo potencial para metástases (Maiolino *et al.*, 2001). As metástases são frequentemente encontradas em estágios avançados ou em tumores pouco diferenciados (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Thomson, 2007). Quando ocorrem, localizam-se geralmente nos linfonodos regionais sendo menos comum em pulmão e outros órgãos (Strafuss *et al.*, 1976; Pulley e Stannard, 1990, Lascelles *et al.*, 2000). Metástases em cães com CCE cutâneo são pouco frequentes, havendo o relato de apenas quatro casos com metástases distantes, sendo três em pulmão, fígado e ossos de um cão que recebeu transplante de medula óssea e um em cão com CCE cutâneo (Hauck, 2013).

2.3. Diagnóstico

O diagnóstico diferencial é amplo, incluindo lesões inflamatórias, tumores de células basais, melanoma, mastocitoma, hemangioma, hemangiossarcoma, tumores dos folículos pilosos e tumores das glândulas sebáceas. A citologia fornece um diagnóstico presuntivo, porém biopsia da

massa tumoral, seguida do estudo histopatológico, é a abordagem diagnóstica mais apropriada. Nos casos de anaplasia intensa, o exame imunoistoquímico é importante para definir a histogênese (Costa *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2013).

2.3.1 Citologia

A citologia é um método rápido, fácil, não invasivo que pode fornecer o diagnóstico de CCE, sendo muitas vezes a primeira técnica de diagnóstico, especialmente para as lesões cutâneas. Como acontece com outras neoplasias epiteliais, CCE tende a esfoliar facilmente, visto que as amostras são ricas em celularidade. Entretanto, muitos casos são ulcerados e inflamados, podendo mascarar a população de células neoplásicas. Além disso, condições inflamatórias primárias podem induzir hiperplasia e displasia epitelial, que podem se semelhar a neoplasia. O exame histopatológico da lesão pode ser necessário para um diagnóstico definitivo nestas situações (Webb *et al.*, 2009).

2.3.2. Histopatologia

Ao exame histopatológico, a lesão caracteriza-se, inicialmente por hiperplasia e displasia epidérmica, hiperqueratose, parakeratose e acantose. Com a evolução ocorre invasão da derme (Goldschmidt e Hendrick, 2002) com formação de ilhas, cordões e trabéculas de células epiteliais neoplásicas que podem apresentar queratinização central e formação de pérolas córneas, dependendo da diferenciação do tumor (Weedon *et al.*, 2006; Yanofsky *et al.*, 2011). As células tumorais individuais são grandes, ovoides, com abundante citoplasma eosinofílico e frequentemente contêm núcleo vesicular com um único nucléolo central e proeminente (Goldschmidt e Hendrick, 2002; Weedon *et al.*, 2006).

O sistema de classificação de tumores da Organização Mundial de Saúde (OMS), em humanos, classifica esta neoplasia em bem diferenciada,

moderadamente diferenciada e pobremente diferenciada, segundo o grau de anaplasia e queratinização (Weedon, 2006). Em medicina veterinária, alguns autores classificam histologicamente o CCE em três graus de diferenciação (WHO, 1998; Barbosa *et al.*, 2009; Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011) e outros classificam no apenas em diferenciado ou pouco diferenciado (Ramos *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2013).

O CCE cutâneo bem diferenciado é semelhante ao epitélio escamoso, com progressão ordenada de células basais poliédricas não queratinizadas na periferia dispostas em cordões compactos ou ninhos de tamanhos variados, com abundante tecido conjuntivo e grande quantidade de queratina, o que determina a formação de pérolas de ceratina lamelada no centro das ilhas (Weedon, 2006; Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011) (Figura 1). As pontes intercelulares frequentemente são visíveis (Yanofsky *et al.*, 2011). Em contraste, no moderadamente diferenciado há células proliferativas formando cordões ou ninhos de células separadas por estroma fibroso com maior pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e queratinização em menor grau que no estágio bem diferenciado. No CCE pouco diferenciado existe marcado pleomorfismo nuclear demonstrando um elevado grau de atipia com numerosas mitoses e mínima quantidade de queratina, sem a formação das pérolas (Weedon, 2006; Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011) (Figura 2).

Ocasionalmente, pode haver infiltração ao longo dos feixes nervosos, na adventícia dos vasos sanguíneos e linfáticos. A presença de linfócitos neurais indica que pode haver invasão perineural nas seções mais profundas. Geralmente acompanha o processo neoplásico um infiltrado subagudo a crônico de células inflamatórias, que varia de leve a moderado, podendo incluir alguns eosinófilos (Weedon *et al.*, 2006).

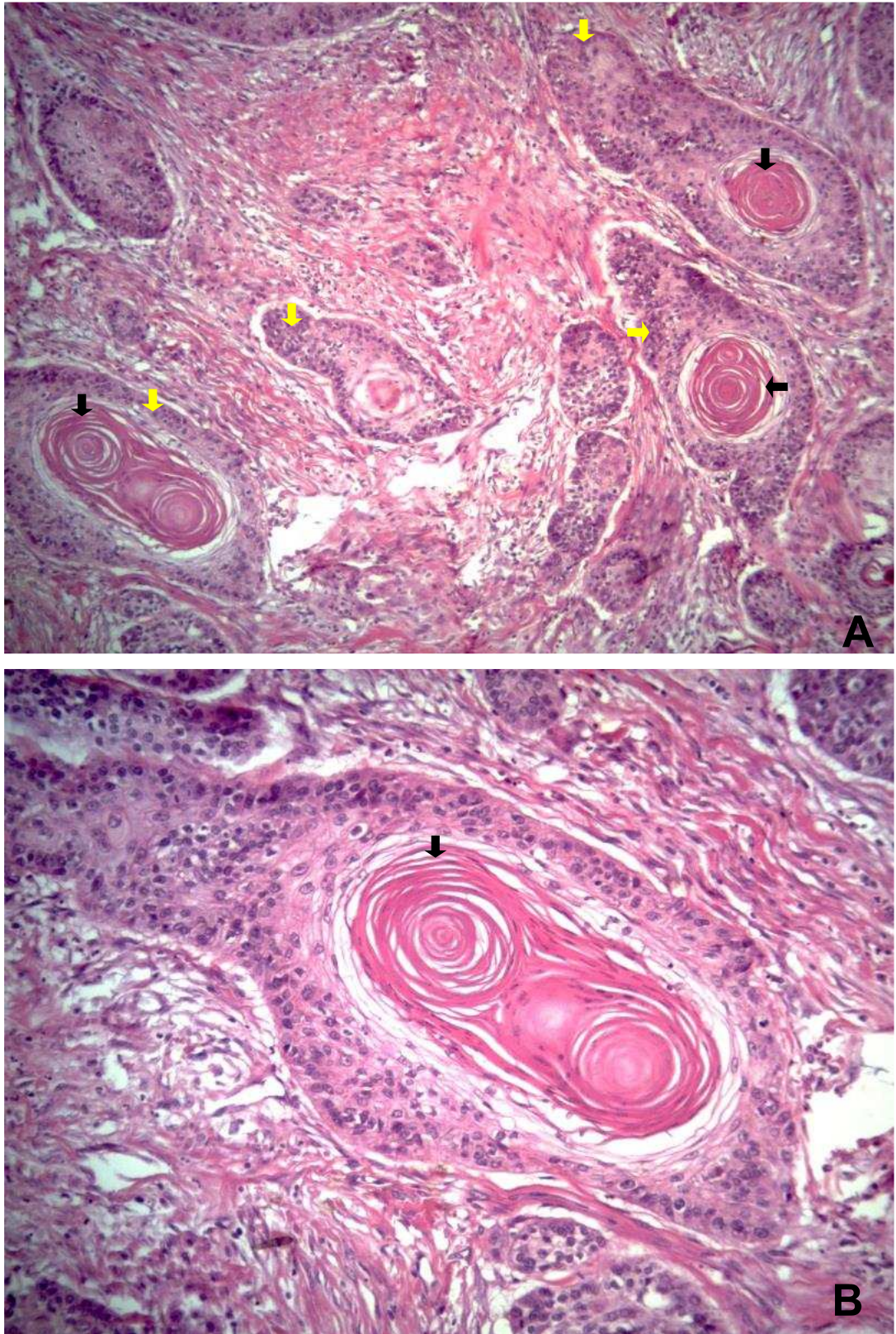


Figura 1. Carcinoma de células escamosas cutâneo bem diferenciado em um cão. A. notar as ilhas com queratinização (setas amarelas) e formação de pérolas de queratina central (setas pretas). H&E, 10 X. B. Pérolas de queratina (seta preta). H&E, 20X.

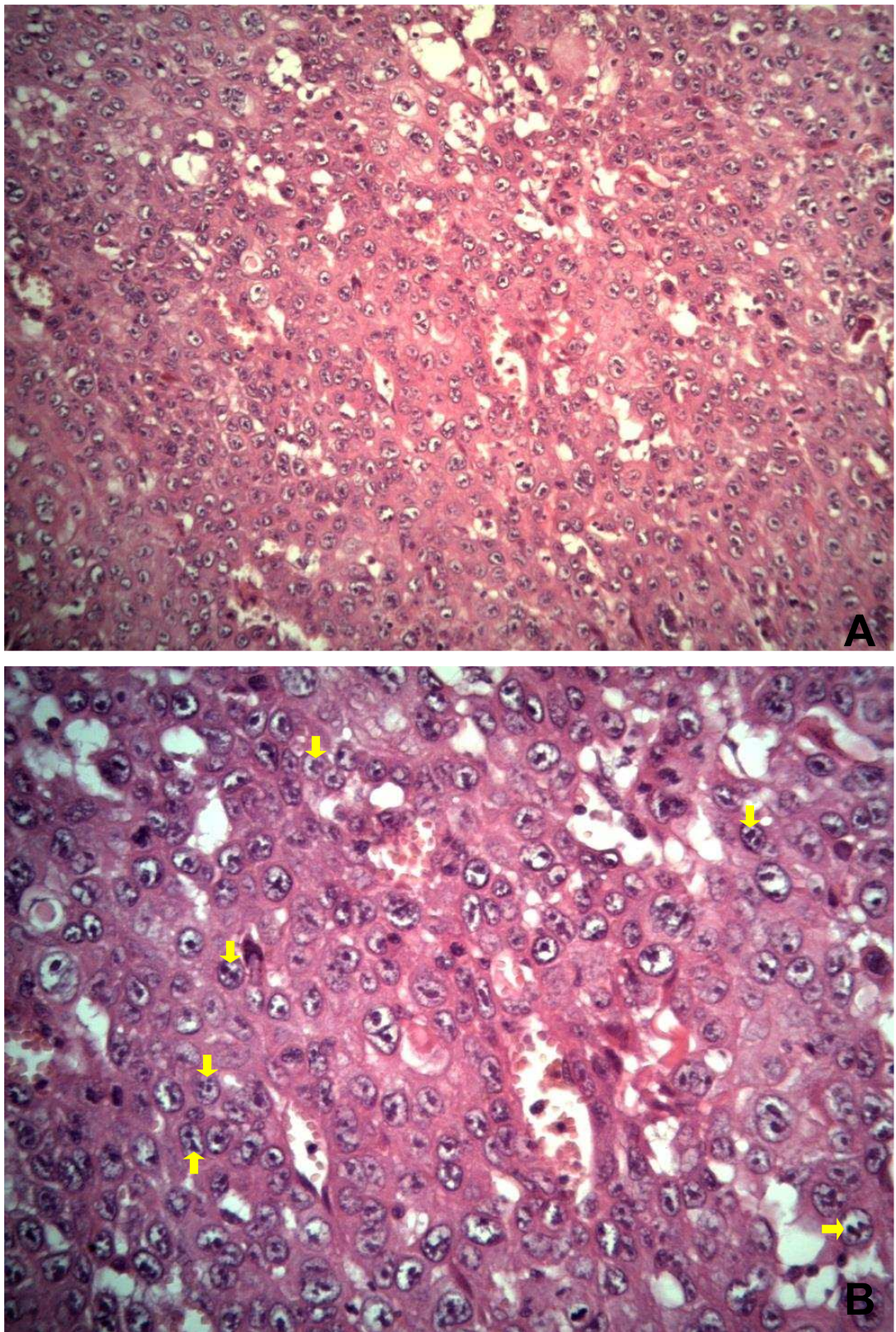


Figura 2. Carcinoma de células escamosas cutâneo pouco diferenciado em um cão. A. Queratinócitos atípicos, presença de abundantes mitoses. H&E, 10X. B. Destaque da lâmina A. H&E, 40X (setas amarelas).

2.3.3. Imunoistoquímica

Na atualidade, a imunoistoquímica é uma ferramenta diagnóstica fundamental em dermatopatologia, ajudando no diagnóstico e prognóstico de muitos tipos de neoplasias cutâneas (Fuertes *et al.*, 2013). A detecção imunoistoquímica de citoqueratina é realizada para confirmar o diagnóstico de neoplasias epiteliais em medicina humana e veterinária (Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011). O CCE cutâneo altamente anaplásico exige a utilização desta técnica com a finalidade de identificar a célula de origem (Webb *et al.*, 2009).

As citoqueratinas (CKs) constituem o maior grupo de filamentos intermédios e são as proteínas filamentosas que, em conjunto com outros filamentos, formam o citoesqueleto das células eucarióticas. Algumas das suas funções são, por conseguinte, a manutenção da estrutura da célula epitelial, proteção contra o trauma e a comunicação entre os componentes citoplasmáticos. As CKs expressam-se em pares e têm padrões de expressão de acordo com a sua localização. São classificadas numericamente de 1 a 20, de acordo com o seu peso molecular e ponto isoelétrico (Fuertes *et al.*, 2013). Um estudo histológico, citológico e imunohistoquímico de 17 CCE em cães mostrou que as citoqueratinas HMW (CK-1, 5, 10 e 14) podem ser consideradas uma ferramenta útil na classificação desta neoplasia porque permite conhecer a origem escamosa do CCE pouco diferenciada (Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011).

2.4. Manejo clínico

Na maioria dos casos de CCE cutâneo diagnosticados precocemente não ocorre metástase. Dessa forma o tratamento local do tumor primário, com adequada margem de segurança resulta em cura na maioria dos casos, principalmente quando se tratam lesões pequenas (Miller *et al.*, 2013). A escolha do tratamento é dependente não somente do estadiamento do tumor, mas do grau de aceitação do proprietário com relação aos efeitos colaterais, às

alterações estéticas, da disponibilidade de equipamentos e fármacos (Moore e Ogilvie, 2001). Protocolos alternativos ou adjuvantes de tratamento físico ou químico incluem a crioterapia, radioterapia, hipertermia, fotoquimioterapia e a quimioterapia intralesional (Thompson, 2007).

2.4.1. Cirurgia

A ampla excisão cirúrgica é uma terapia rápida e eficaz para o CCE cutâneo, sendo o tratamento de eleição quando as lesões são detectadas precocemente. A meta do tratamento cirúrgico é a remoção de tecido suficiente para deixar as margens cirúrgicas livres de células neoplásicas, ao mesmo tempo em que mantém a função e a estética (Rogers, 1994). Recomenda-se a excisão com margem de 1 a 3 cm para o controle de eventuais recidivas da neoplasia (Rodaski e Werner, 2009). As margens devem ser rigorosamente examinadas por um patologista procurando evidência de infiltração tumoral (Larue e Gordon, 2010).

2.4.2 Criocirurgia

A criocirurgia é a destruição de tecido pela utilização controlada de congelamento e descongelamento. O arrefecimento para -20°C provoca a morte celular através da formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares. Isto se maximiza por congelación rápida y descongelación lenta durante tres ciclos (Thomson, 2007). Muitos cirurgiões utilizaram a temperatura de -20°C como temperatura-alvo para o tratamento de tumores malignos, no entanto, vários estudos têm demonstrado que esta temperatura não é adequada, exceto para tumores benignos. No tratamento crioterápico de tumores do tipo carcinoma basocelular e carcinoma de células escamosas, as se requerem temperaturas no tecido-alvo em torno de -50°C , temperatura na qual ocorre congelamento total da pele (Queiroz e Matera, 2003).

A formação do gelo extracelular altera o gradiente osmótico entre o meio intracelular e o extracelular produzindo um efeito hiperosmolar que extrai água do meio intracelular e induz uma concentração tóxica de eletrólitos, a qual provoca um dano irreversível à célula. O aumento da concentração intracelular de eletrólitos resulta em alterações do pH nas macromoléculas e na membrana da célula. A formação do gelo intracelular é dependente do tempo de congelamento e de uma temperatura mínima atingida. Um congelamento rápido à temperatura baixa resulta numa maior quantidade de gelo intracelular. Desse modo, não ocorre perda de água para o meio extracelular e, na tentativa de manter o equilíbrio, formam-se pequenos cristais intracelulares, os quais provocam danos nas organelas como as mitocôndrias e retículo endoplasmático induzindo a uma destruição celular irreversível. Quanto maior o tamanho dos cristais de gelo, maior o dano induzido por eles (Queiroz e Matera, 2003).

A criocirurgia pode ser uma opção terapêutica viável para o clínico veterinário (Lucas e Larsson, 2006); é relativamente rápida e de fácil aplicação, de baixo custo e segura, evitando, dessa forma, os riscos da anestesia, principalmente para animais idosos (Queiroz e Matera, 2003). Esta técnica é utilizada em áreas em que suturas são contraindicadas, bem como naquelas onde o acesso cirúrgico convencional torna-se difícil pelas próprias características anatômicas da região, como a face e, mais especificamente, narina e pálpebras (Lucas e Larsson, 2006) como também em lesões grandes, onde não é possível o fechamento com sutura (Queiroz e Matera, 2003). Este método é utilizado em lesões superficiais, de quatro mm de diâmetro ou menor, sendo sua desvantagem a maior taxa de recorrência associada a tumores maiores que 0,5 centímetros (Thomson, 2007). Há poucos autores que indicam este procedimento para lesões amplas. Alguns referem o seu uso em lesões com até um cm, no máximo, outros mencionam 2,5 cm, e outros indicam ainda sete cm. Contudo, no estudo realizado em gatos utilizando criocirurgia Lucas e Larsson (2006) alcançaram resultados excelentes com plena e total remissão do quadro neoplásico em 72% dos animais, com em lesões de até nove cm. Neste estudo em gatos, mesmo nos casos em que o tratamento não levou à remissão total das lesões, houve um prolongamento do tempo médio de vida.

Em cães, foi referida uma taxa de sucesso de 75% em pacientes com CCE tratados com criocirurgia.

A criocirurgia nem sempre tem resultados satisfatórios para o controle de CCE. Em um estudo que empregou a criocirurgia no tratamento de 15 gatos com CCE nasal e auricular, quatro permaneceram livres da doença por mais de seis meses (Rodaski e Werner, 2009).

2.4.3. Radioterapia

Radioterapia é uma opção de tratamento para a doença local ou regional avançada principalmente em pacientes idosos com comorbidades quando outros tratamentos não podem ser realizados (Bejar e Maubec, 2014), igualmente nos tumores pouco diferenciados (Guedes *et al.*, 1998). O controle local do tumor pode ser alcançado com o emprego de cirurgia, radioterapia ou uma combinação das duas técnicas (Bejar e Maubec, 2014). Esta técnica pode ser utilizada no caso que as margens cirúrgicas estejam comprometidas e a ressecção cirúrgica não seja possível, ou com a expectativa de converter um tumor inoperável em um operável (Larue e Gordon, 2010).

Outra modalidade de radioterapia é a braquiterapia, em que uma fonte radioativa é aplicada diretamente no tecido afetado (Théon, 1996; Thomson, 2007). Este contato entre a fonte e a lesão permite diminuir a dose de radiação utilizada, possibilitando uma dose total cumulativa maior. A braquiterapia com estrôncio-90 (^{90}Sr) é normalmente usada em lesões superficiais de pele com menos de 2cm de espessura e lesões pequenas que não foram completamente extraídas com a cirurgia. A dose recomendada é de 120 a 150 Gy numa única sessão (Théon, 1996).

No tratamento de tumores superficiais, efeitos secundários para a pele são esperados e estão restritas ao campo de radiação. A severidade do efeito está relacionada com a dose, e o paciente pode ter uma variedade de lesões, entre as quais está a depilação que em alguns casos pode ser permanente, hiperpigmentação ou leucotriquia (Larue e Gordon, 2010). Limitações para o uso são geralmente observados pela pouca disponibilidade

de equipamento, o alto custo, equipe especializada e a exigência de múltiplas anestésias (Thomson, 2007).

2.4.4. Quimioterapia

Existem poucos dados sobre o uso de quimioterapia para tratar CCE cutâneo em cães (Hauck, 2013). A quimioterapia sistêmica é utilizada para fornecer alívio paliativo para caninos e felinos com lesões disseminadas ou metastáticas. A quimioterapia para o CCE pode ser administrada pelas vias tópica, intralesional ou sistêmica (Kraegel, 2004). Himsel e colaboradores (1986) trataram dois cães com CCE metastático com cisplatina. Um dos cães com metástase (linfonodo axilar e pulmão) mostrou marcada redução no número e tamanho dos nódulos pulmonares, assim como uma resposta parcial do tumor axilar após quimioterapia com cisplatina. No entanto, o paciente recaiu 4,5 meses após o início do tratamento e foi submetido à eutanásia. O outro cão teve uma resposta completa e duradoura das múltiplas lesões (>22 meses). No entanto a dose utilizada neste estudo não está disponível na literatura. Embora, a quimioterapia sistêmica tenha atividade limitada no CCE, a quimioterapia intralesional tem sido utilizada com sucesso em cães com CCE cutâneo (Miller *et al.*, 2013). A carboplatina intratumoral, na dose de 100mg/m² de superfície corpórea, com ou sem óleo de gergelim purificado, foi utilizada em 18 gatos com estágios avançados de carcinoma de células escamosas localizados no plano nasal por Théon *et al.* (1996). Segundo estes autores, o uso do óleo de gergelim reduziu a exposição sistêmica à carboplatina e evitou a perda do quimioterápico pelos locais de injeção.

O uso de 5-fluorouracil em cães, como tratamento neoadjuvante à cirurgia para os casos de carcinoma de células escamosas, mostrou-se um procedimento seguro, devendo ser considerado nos casos de tumores de maiores dimensões ou disseminados, nos quais a correta técnica de ressecção cirúrgica fica prejudicada, bem como na prevenção das recidivas tumorais. Este é um quimioterápico do grupo dos antimetabólitos que interfere na síntese de DNA e RNA por inibição enzimática. É comumente utilizado pela via parenteral,

também sendo descrita a utilização local como pomada ou injeção intratumoral. O custo da terapia com 5-fluorouracil tópico é relativamente baixo e esse quimioterápico apresenta baixa toxicidade inespecífica, provocando apenas mielotoxicidade discreta. Entretanto, pode desencadear toxicidade neurológica de ocorrência aleatória no cão. Em felinos, o uso de 5-fluorouracil é contraindicado (Ferreira *et al.*, 2009).

Recentemente Costa e colaboradores (2013) relataram o uso quimioterapia em um cão SRD com CCE cutâneo em região do tarso com ciclofosfamida ($150\text{mg}/\text{m}^2$) e doxorrubicina ($30\text{mg}/\text{m}^2$), por via intravenosa por quatro sessões, como uma medida de controle da evolução do quadro neoplásico após quatro sessões de crioterapia. O período de avaliação depois da cura é de mais 30 meses, sem evidência clínica ou por imagem de recidiva ou focos de metástase.

2.4.4. Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia caracteriza-se pela associação de agentes antineoplásicos como bleomicina e cisplatina, que têm baixa permeabilidade devido às suas propriedades químicas ou à falta de mecanismos de transporte que as façam atravessar a membrana, com pulsos elétricos curtos, intensos e de caráter local (eletroporação), com o intuito de maximizar a concentração intracelular destes fármacos, propiciando uma maior ação citotóxica (Cirial e López, 2001; Cemazar *et al.*, 2008). Uma injeção intra-tumoral de agentes quimioterápicos a doses baixas tem sido utilizados para obter uma concentração elevada da droga nas células tumorais após eletro pulsação, e ao mesmo tempo, evitar a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos (Cemazar *et al.*, 2008). Silveira *et al.* (2010) avaliaram a utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de 34 cães, dos quais 7 tinham diagnóstico de carcinoma espinocelular. O sulfato de bleomicina foi administrado pela via intralesional, na dose de $1\text{ U}/\text{cm}^3$ de tumor e três minutos após a aplicação do fármaco, administraram-se pulsos elétricos sobre toda extensão da neoformação por

meio de aparelhagem destinada a tal fim. Após o tratamento, três dos cães não apresentaram resposta a satisfatória após duas sessões sendo posteriormente excisados cirurgicamente.

As vantagens da eletroquimioterapia são a fácil realização, nível ambulatorial e alta eficácia do tratamento. Os tumores regredem após uma sessão, mas se os tumores são grandes ou a 1ª sessão não erradicou o tumor completamente, a eletroquimioterapia pode ser repetida com melhoria da eficácia do tratamento (Cemazar *et al.*, 2008).

2.5. Prognóstico

O grau de diferenciação histológica, e o local anatômico da lesão determinam o prognóstico do CCE cutâneo. Além disso, tumores grandes, pouco diferenciados, que mostram infiltração profunda na derme e tecido subcutâneo são associados a uma maior probabilidade de recidivas e metástases (Yanofsky *et al.*, 2011).

Em humanos, o fator histológico com maior valor preditivo para a metastização de CCE é a profundidade. Lesões com menos de 2 mm de profundidade não metastizam, enquanto lesões com mais de 5-6 mm ou que invadam o músculo, cartilagem ou osso, têm um potencial metastático aproximadamente 20% superior (Gross *et al.*, 2005).

A OMS propôs um sistema de estadiamento de tumores de pele em cães e gatos que permite classificar a evolução tumoral e, com base nesses dados, tomar as decisões terapêuticas mais apropriadas (Tabela 1). Entretanto, o sistema de estadiamento atual da OMS para medicina veterinária não tem estágio intermédio entre Tis (carcinoma *in situ*) e T1 (< 2 cm), o que impede que se faça a distinção entre CCEs superficiais invasivos e os CCEs que se encontram na parte profunda da derme (Gross *et al.*, 2005).

Tabela 1. Classificação TNM de tumores com origem na epiderme e derme de cães (exceto linfoma e mastocitoma).

T-Tumor Primário:

Tis-Carcinoma pré-invasivo (carcinoma in situ)

T0-Sem evidência de tumor

T1-Tumor com diâmetro máximo < 2cm, superficial ou exofítico

T2-Tumor com diâmetro máximo 2-5cm, ou com invasão mínima independentemente do tamanho

T3-Tumor com diâmetro máximo > 5cm, ou com invasão subcutânea, independentemente do tamanho

T4-Tumor invade outras estruturas como fáscia, músculo, osso ou cartilagem

(Quando ocorre mais do que um tumor em simultâneo, deve ser registado o número exato de tumores. O tumor com a categoria T mais elevada é selecionado, e o número de tumores indicado em parenteses. Cada novo tumor que vier a surgir deve ser classificado independentemente).

N-Linfonodos regionais (LR):

N0- Sem evidência de envolvimento de LR N1-Linfonodos ipsilaterais com mobilidade

N1a. Linfonodos considerados sem aumento de tamanho

N1b. Linfonodos considerados aumentados de tamanho

N2-Linfonodos contralaterais ou bilaterais com mobilidade

N2a. Linfonodos sem crescimento

N2b. Linfonodos com crescimento

N3-Linfonodos fixos (-) histologicamente negativos, (+) histologicamente positivo

M-Metástases distantes:

M0-Sem evidência de metástases distantes

M1-Metástases distantes detectáveis (locais específicos)

Fonte: Morris e Dobson (2002)

3. CONSIDERAÇÕES

O carcinoma de células escamosas cutâneo em cães varia em aparência, localização e comportamento biológico; no entanto, é agressivo localmente, com um baixo potencial metastático. A precocidade no diagnóstico tem efeito fundamental no prognóstico. O prognóstico é favorável para cães

com CCE cutâneo bem diferenciado que possam ser completamente excisados e sem invasão vascular, linfática ou metástases distantes. Por outro lado, o prognóstico é desfavorável para pacientes com tumores inoperáveis ou pouco diferenciados com metástases. A prevenção é muito importante e proprietários de animais suscetíveis ao desenvolvimento deste tumor devem ser instruídos a limitar ao máximo a exposição desses animais à luz solar. É importante ressaltar que a colaboração e uma boa relação entre o médico veterinário e o proprietário são necessárias para garantir o sucesso do diagnóstico e terapêutica desta neoplasia cutânea.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, J.; DUARTE, M.; OLIVEIRA, C.; REIS, A.; PEIXOTO, T.; PEIXOTO, P.; BRITO, M. Carcinoma de células escamosas perineal em cabras no Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 421-427, 2009.
- BEJAR, C.; MAUBEC, E. Therapy of Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Skin. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 15, p. :302–320, 2014.
- BRAVO, D. T.; CRUZ-CASALLAS, P.; OCHOA, J. A. Prevalencia de neoplasias en caninos en la universidad de los Llanos, durante 2004 a 2007. **Revista MVZ Córdoba**, v. 15, n. 1, p. 1925-1937, 2010.
- CARDONA, J. A.; VARGAS, M.I.; PERDOMO, S.C. Estudio Clínico e Histopatológico del Carcinoma de Células Escamosas de Bovinos en el Departamento de Córdoba, Colombia. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela**, v. 54, n 2, p. 68-77, 2013.
- CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA,G.; TOZON, N.; MIR, L.M.; MIKLAVCIC, D.; LOWE, R.; TEISSIE, J. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 826–831, 2008.
- CHANDRASHEKARAI AH G.B.; RAO, S; MUNIVENKATAPPA, B. S.; MATHUR, K. Y. Canine Squamous Cell Carcinoma: a Review of 17 Cases. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n. 2, p. 79-86, 2011.
- CIRIAL, H. C.; LÓPEZ, D. S. La electroquimioterapia: una nueva alternativa terapéutica en la oncología. **Revista Cubana de Oncología**, v. 17, n. 3, p. 188-194, 2001.
- COSTA, C.J; PAIVA, V.C.; RAMOS, S.D.; HUPPES, R.; BARDOZA, A.D.; GASPAR, A. R.; RIVERA, L. C.; RAMIREZ, R.U. Criocirurgia no tratamento de carcinoma de células escamosas em cão. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 5, n. 1, p. 213-221, 2013.
- FERREIRA, K.C.R.S.; OLIVEIRA, R.T.; GOMES, C.; FERNANDES, A.O.; CARDOSO, C.S.; GARCEZ, 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.

FUERTES. L.; C. SANTONJA; H. KUTZNER; L. REQUENA. Inmunohistoquímica en dermatopatología: Revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte I). **Actas Dermosifiliográficas**, v.104 n. 2, p. 99- 127, 2013.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, J. D. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Iowa State Press, 2002. p.45-118.

GOLDSCHMIDT, M.H.; KENNEDY, J.S.; KENNEDY, D.R.; YUAN, H.; HOLT, D.E.; CASAL, M.L.; TRAAS, A.M.; MAULDIN, E.A.; MOORE, P.F.; HENTHORN, P.S.; HARTNETT, B.J.; WEINBERG, K.I.; SCHLEGEL, R.; FELSBURG, P.J. Severe papillomavirus infection progressing to metastatic squamous cell carcinoma in bone marrow-transplanted X-linked SCID dogs. **Journal of Virology**, v. 80, p. 6621–6628, 2006.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Skin diseases of the dog and cat clinical and histopathologic diagnosis**. 2nd ed. Blackwell Science, Ames. 2005. 932p.

GUEDES, A.G.P.; SHMITT, I.; PIPPI, N.L. Dermatite Solar Felina Associada a Carcinoma Epidermóide. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.28, n. 4, p. 707-713, 1998.

GUÉRIOS, S.; PÊS, M.; GUIMARÃES, F.; ROBES, R.; RODIGHERI, S.; MACEDO, T. Carcinoma de células escamosas do plano nasal em felinos: por que optar pelo tratamento cirúrgico. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.1, n.3, p.203-209, 2003.

HAUCK, M.L. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PASE, R.L. Withrow & Mac Ewents. **Small animal clinical oncology**. 5ed. 2013. p. 305- 320.

HIMSEL, C.A.; RICHARDSON, R.C.; CRAIG, J.A. Cisplatin chemotherapy for metastatic squamous cell carcinoma in two dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 12, p. 1575-8, 1986.

KRAEGEL, S. A.; MADEWELL, B. R. Tumores da Pele. In: ETTINGER, S. J.; FELDMANN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, cap. 99, p.555-557. 2004.

LARUE, S.M.; GORDON, I.K. Radiation therapy. In: WITHROW, S.J.; VAIL, D.M.; PASE, R.L. Withrow & Mac Ewents. **Small animal clinical oncology**. 5ed. 2013. p. 180- 210.

LASCELLES, B.; PARRY, A.; STIDWORTHY, M.; DOBSON, J.; WHITE, R. Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. **The Veterinary Record**, v.147, p.473-476, 2000.

LI G.; STURGIS, E.M. The role of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Current Oncology Reports**, v. 8, n. 2, p.130-139, 2006.

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

MAIOLINO, P.; PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G. Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: an immunohistochemical and quantitative Analysis. **Journal Comparative Pathology**, v.125, p.117-121, 2001.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 7th edith : Elsevier, 2013. P. 774 – 843.

MOORE, A.S.; OGILVIE, G.K. Skin tumors. In: OGILVIE, G.K.; MOORE, A.S. **Feline oncology**. Veterinary Learning Systems, USA, 2001. p.398-428.

MORRIS, J.; DOBSON, J. Oncologia en pequeños animales. Buenos Aires: Intermédica. 2002.

PULLEY L.T.; STANNARD A.A. Tumors of the skin and soft tissues, In: MOULTON J.E. (3Ed.), **Tumors in Domestic Animals**. University California Press, Los Angeles, 1990. p.23-87.

QUEIROZ, G. F.; MATERA, J. M. Criocirurgia no tratamento de tumores. **Revista Educ. Continuada do CRMV-SP** v. 6, n. 1/3, p. 53-62, 2003.

RAMOS, A.; NORT, D.; ELIASI, F.; FERNANDES, C. Carcinoma de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos: estudo de 50 casos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 5-13, 2007.

RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 1994 e comentários sobre algumas doenças. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico, Pelotas**, v.15, p. 8-20, 1995.

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

ROGERS, K.S. Feline cutaneous squamous cell carcinoma. **Feline Practice**, v.22, n.5, p.7-9, 1994.

SILVEIRA, L. M.G.; BRUNNER, C.H.M.; CUNHA, F.F.; CALDERARO, F.F.; KOZLOWSKI. Utilização de eletroquimioterapia em neoplasias de origem epitelial ou mesenquimal localizadas em pele ou mucosas de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 55-66, 2010.

STRAFUSS, A.; COOK, J.; SMITH, J. Squamous cell carcinoma in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.168, p.435-427, 1976.

THÉON, A.P. et al. Intratumoral administration of carboplatin for treatment of squamous cell carcinomas of the nasal plane in cats. **American Journal Veterinary Research**, v.57, n.2, p.205-210, 1996.

THOMSON M. Squamous Cell Carcinoma of the Nasal Planum in Cats and Dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**. V.22, p. 42-45, 2007.

TORRES-VIDALES G. **Estudio histológico retrospectivo de tumores en caninos diagnosticados en el laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, 2003.** (Tesis de especialización)- Departamento de Ciencias para la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

WAROPASTRAKUL S.; MUNDAY, J.S.; FRENCH, A. F. Infrequent detection of papillomaviral DNA within canine cutaneous squamous cell carcinomas, haemangiosarcomas and healthy skin on the ventrum of dogs. **Veterinary Dermatology**, v.23, p. 197–e41, 2012.

WEBB J. L.; BURNS; R.E.; BROWN, H.M.; LEROY, B.E.; KOSAREK, C.E. Squamous Cell Carcinoma. **Compendium: Continuing Education for Veterinarians**. March 2009.

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.

WHO. International Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 3, p. 106, 1998.

WOBESER, B. K.; KIDNEY, B. A.; POWERS, B. E.; WITHROW, S. J.; MAYER, M. N.; SPINATO, M. T.; ALLEN, A. L. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. **Veterinary Pathology**, v.44, p.355-361, 2007.

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, 2011.

YANOFSKY, V.R.; MERCER, S.E.; PHELPS, R.G. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. **Journal of Skin Cancer Volume**, 2011, p. 1-13, 2011.

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

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III NO ESTROMA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES

CARACTERIZAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I E III NO ESTROMA DO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS CUTÂNEO EM CÃES.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi a caracterização das fibras de colágeno tipo I e III no estroma de carcinoma de células escamosas (CCE) cutâneo em cães. Para este trabalho, utilizou-se 44 amostras de pele incluídas em parafina do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Provet-SP, que tiveram prévio diagnóstico de CCE. Estas amostras foram processadas histologicamente e coradas com hematoxilina/eosina para confirmação do diagnóstico e classificação do grau de diferenciação celular; coloração histoquímica de Picrosirius Red/polarização para observar o colágeno tipo I e III. O colágeno tipo III mostrou maior expressão nos CCE cutâneos bem diferenciados, porém, isto só foi evidente quando as amostras foram classificadas em apenas dois graus de diferenciação: bem diferenciadas ou pouco diferenciadas. O colágeno tipo I não apresentou diferença estatística entre cabeça, tronco e membros. Entretanto, para o colágeno do tipo III, a análise revelou que a quantidade expressa no tronco é significativamente maior que no membro. Mais estudos são necessários para obter resultados mais conclusivos que contribuam no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Palavras-chave: hematoxilina/ eosina; neoplasia epitelial; pele; Picrosirius red/polarização.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize type I and III collagen fibers in the stroma of cutaneous SCC in dogs. For this work, were used 44 paraffin-embedded samples from Histopathology Laboratory of Universidade Federal de Viçosa (UFV) and Provet-SP, with previous diagnostic of squamous cell carcinoma. Samples were processed and evaluated histologically with

hematoxylin/eosin to confirm the diagnosis and classification of cell differentiation degree and with Picrosirius red staining/polarization for observation of types I and III collagen. Type III collagen expression was higher in well-differentiated SCC, however, it was only evident when samples were classified into only two degrees of differentiation: well differentiated or poorly differentiated. Type I collagen showed no statistical difference between head, trunk and limbs. However, for type III collagen, the analysis showed that the quantity expressed in the trunk is significantly larger than the member. Further studies are needed to obtain more conclusive results that contribute in the diagnosis, prognosis and treatment.

Keywords: epithelial neoplasm; hematoxylin/eosin; skin; Picrosirius red/polarization.

1. INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) tem um papel importante na regulação do desenvolvimento, na função e homeostase de todas as células eucarióticas. Além de fornecer suporte físico para as células, a MEC participa ativamente no estabelecimento, separação e manutenção dos tecidos diferenciados através da regulação dos fatores de crescimento, receptores, nível de hidratação e o pH do ambiente. A arquitetura da MEC é altamente organizada, como resultado das propriedades inatas de suas moléculas constituintes e suas interações, bem como as atividades de células residentes. As interações entre as células e o meio ambiente que é criado pela MEC têm um papel importante no direcionamento dos processos em desenvolvimento, a homeostase e patogênese do câncer (Mouw *et al.*, 2014).

A MEC é principalmente composta por duas classes de macromoléculas: proteínas fibrosas (incluindo colágenos e elastina) e glicoproteínas (incluindo fibronectina, proteoglicanos e laminina) (Mouw *et al.*, 2014). O colágeno é a proteína mais comum no reino animal, constituindo o arcabouço extracelular para todos os organismos multicelulares e, atualmente, são conhecidos 27 tipos diferentes de colágeno, codificados por 41 genes dispersos em 14 cromossomos (Kumar *et al.*, 2010).

O colágeno pode ser classificado em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila (tipo I, II e III) e os não fibrilares (tipo IV). O colágeno tipo I é o mais abundante, ocorrendo em uma variedade de tecidos, fornecendo alta resistência à tensão da pele, tendões e ligamentos; o colágeno tipo II predomina em cartilagens hialinas e elásticas; e o colágeno tipo III está presente em virtualmente todos os tecidos conjuntivos em proporção variada ao colágeno tipo I (Junqueira *et al.*, 1983). Os não fibrilares formam um grupo heterogêneo que inclui os colágenos das membranas basais (tipo IV) (Linsenmayer, 1991).

Cada molécula de colágeno esta composta de três cadeias alfa que formam um trímero na forma de hélice tripla (Kumar *et al.*, 2010). Essas cadeias não são totalmente idênticas e, de acordo com suas diferenças, são descritos os tipos de colágeno. O colágeno tipo I consta de duas cadeias idênticas alfa 1 e uma cadeia alfa 2. O tipo III possui as moléculas organizadas em três cadeias alfa 1 (Ross *et al.*, 1993).

O colágeno desempenha importantes funções estruturais e morfogênicas em matrizes e membranas basais em muitos tecidos e órgãos (Iwasaki *et al.*, 2012). Na derme, o colágeno é um componente importante e desempenha um papel chave na resistência e elasticidade da pele (Verhaegen *et al.*, 2012). As fibras colágenas representam 90% de todas as fibras dérmicas e 80% da matriz extracelular dérmica. O colágeno tipo I, III e V são os que predominam na derme, sendo responsáveis por aproximadamente 87%, 10% e 3%, respectivamente, do colágeno dérmico (Miller *et al.*, 2013).

A MEC está em constante remodelação e sua síntese e degradação acompanha a morfogênese, a regeneração, a cura de feridas e, os processos fibróticos crônicos (Kumar *et al.*, 2010). Estudos recentes na medicina humana têm mostrado que as interações das células tumorais com o microambiente tecidual, especialmente com as proteínas da MEC, sugerem que a MEC desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e progressão do tumor (Koenig *et al.*, 2006; Lin e Yun, 2010). As fibras de colágeno tipo I são o principal componente estrutural do estroma em diversos tumores e a sua presença, reduz a adesão celular e contribui para a progressão do câncer (Koenig *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2009, Moro *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Provenzano *et al.* (2008) sugerem que uma alta densidade de fibras colágenas

tipo I aumenta significativamente a iniciação, progressão e metástase do tumor. Este tipo de colágeno pode ser considerado como um biomarcador potencial em câncer de mama com metástase para o pulmão (Kakkad *et al.*, 2012).

O estudo histoquímico do colágeno com ajuda da imunocitoquímica e o método de Picrosirius Red/polarização (PR/P) contribuíram significativamente para aprofundar o conhecimento da função do colágeno e sua patologia nas duas últimas décadas (Montes, 1996). Picrosirius Red é uma coloração seletiva de tecido conjuntivo (Sweat *et al.*, 1964) que permite uma análise qualitativa das fibras colágenas do tecido conjuntivo. Quando observadas sob luz polarizada, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados, essa coloração permite a diferenciação principalmente das fibras tipo I e tipo III (Sweat *et al.*, 1964; Montes, 1996).

O principal uso de PR/P é a coloração de colágeno e a diferenciação das fibras colágenas (Weatherford, 1972), porém também tem sido utilizada para o diagnóstico diferencial de neoplasias fibrocíticas (Koren *et al.*, 2001). Na medicina veterinária não há relatos de quantificação do colágeno tipo I e III por meio desta técnica, para carcinoma de células escamosas (CCE) cutâneo em caninos. Portanto, este trabalho tem como objetivo caracterizar as fibras de colágeno tipo I e III no estroma de CCE cutâneo em cães segundo o grau de diferenciação neoplásica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 44 amostras de pele canina incluídas em parafina (blocos de parafina) provenientes do Laboratório de Histopatologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do laboratório Provet- SP, durante o período de 2000 a 2014, com diagnóstico histopatológico de carcinoma de células escamosas cutâneo. Não existiu restrição de sexo, raça ou faixa etária para a seleção e conformação dos grupos. Este estudo foi realizado após a aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de ética para uso de animais da UFV (protocolo nº 78/2014).

Os blocos de parafina foram cortados com espessura de 5 µm, Corados com hematoxilina/ eosina (H/E) para avaliação histopatológica e, pela coloração histoquímica PR/P para observação de fibras de colágeno (tipo I e III), respectivamente.

Os cortes histológicos corados com H/E foram observados em microscópio óptico de luz para confirmar o diagnóstico e definir o grau de diferenciação tumoral. Os tumores foram classificados de duas formas: na primeira considerou-se três graus de diferenciação de acordo com sua aparência histológica em bem diferenciado, moderadamente diferenciado, e pouco diferenciado (WHO, 1998; Barbosa *et al.*, 2009; Chandrashekaraiiah *et al.*, 2011). A segunda utilizou-se apenas dois graus de diferenciação: bem diferenciado e pouco diferenciado (Ramos *et al.*, 2007; Cardona *et al.*, 2013). O critério histológico foi o seguinte:

Bem diferenciado: O tumor é semelhante ao epitélio escamoso, com progressão ordenada de células basais poliédricas não queratinizadas na periferia, as quais estão dispostas em cordões compactos ou ninhos de tamanhos variados, com abundante tecido conjuntivo e grande quantidade de queratina, o que determina a formação de pérolas de queratina lameladas no centro das ilhas.

Moderadamente diferenciado: Presença de células proliferativas formando cordões ou ninhos de células, separadas por estroma fibroso com pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e queratinização em menor grau que o estágio bem diferenciado.

Pouco diferenciado: Existem células imaturas com numerosas mitoses, com ausência de ninhos de células e mínima quantidade de queratina sem a formação das perolas de queratina.

Quando foram considerados dois graus de diferenciação tumoral os CCE moderadamente diferenciados foram considerados como bem diferenciados e os pouco diferenciados seguiram o mesmo critério usado para os três graus de diferenciação tumoral.

Todos os cortes foram corados com PR/P e examinados no microscópio de luz com opção de polarização (Olympus BX-53 ®, Japão) do Laboratório Associações Micorrízicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária

(BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa. A observação das fibras colágenas com este método permitiu a diferenciação do colágeno tipo I (birrefringência laranja amarelado a laranja e vermelho) e tipo III (birrefringência verde ou verde amarelo) (Coleman, 2011).

Foram selecionados e fotomicrografados 10 campos histológicos com câmera digital (5.0 m) no aumento de 40x. Os campos foram selecionados da esquerda para a direita e de cima para baixo e, para cada campo fotomicrografado, dois campos desprezaram-se, até que fosse obtido o total de dez campos. As imagens foram analisadas com ajuda do *software* Image J com o *plug-in Threshold Colour*, obtendo-se o percentual de colágeno através da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. Os valores para cada tipo de colágeno no *Threshold colour* foram padronizados para todas as imagens do seguinte modo: Matiz 0-40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45/120 para a cor verde (colágeno tipo III), saturação 0-255 e brilho 5-225 para ambos tipos de colágeno (figura 3). Algumas amostras foram avaliadas por planimetria por contagem de pontos para verificar a precisão da análise automática.

A raça, sexo e idade dos animais acometidos foram identificados e analisados descritivamente. As análises estatísticas foram realizadas considerando as duas formas de classificação do grau de diferenciação tumoral encontradas na literatura. Considerando três graus de diferenciação (bem diferenciado, moderado diferenciado e pouco diferenciado) os dados obtidos foram submetidos à ANOVA ou Kruskal-Wallis, conforme a normalidade e homogeneidade de variância. Da mesma forma, foi analisada a expressão dos colágenos segundo a localização anatômica do CCE, utilizando o teste de Tukey em caso de significância no primeiro teste. Para os dois graus de diferenciação tumoral (bem diferenciado e pouco diferenciado) os dados foram submetidos ao teste t de Student ou Mann-Whitney, conforme a normalidade e homogeneidade de variância. A distribuição dos CCEs classificados em dois ou três graus de diferenciação segundo a região do corpo acometida foi avaliada pelo teste qui-quadrado. A análise foi realizada no *software* SigmaPlot 11.0, considerando nível de significância de 5% para todos os testes.

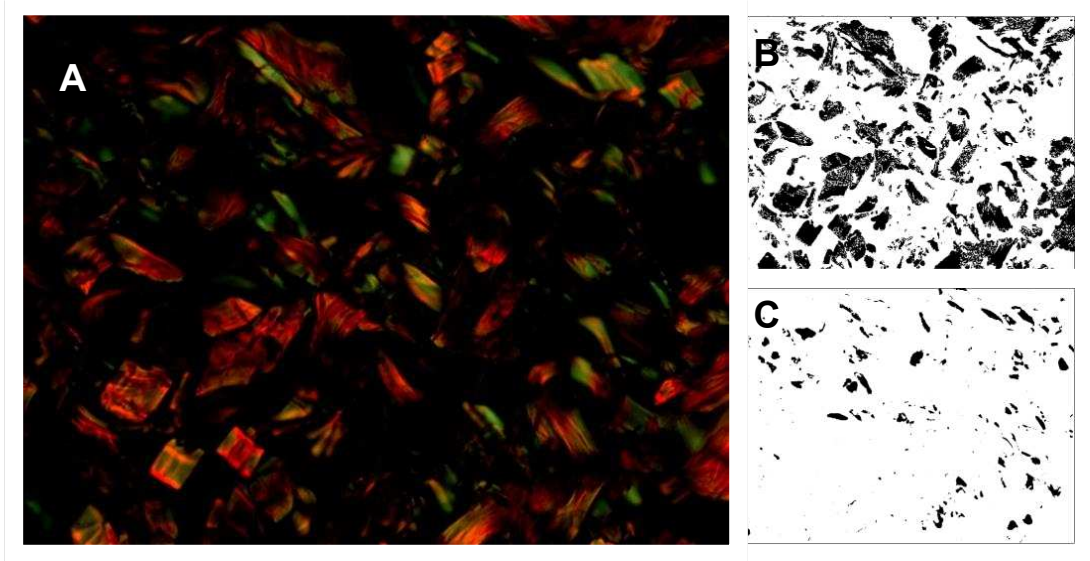


Figura 3. Fotografia de pele normal mostrando a área de colágeno tipo I e III medida com o software Image J usando o *plug-in* Threshold Colour. A) imagem original observada com luz polarizada. B) A cor preta corresponde à área selecionada para medida de colágeno tipo I pelo software. C) Área selecionada para medida do colágeno tipo III.

2. RESULTADOS

Dos 44 casos com diagnóstico de CCE cutâneo que ingressaram no estudo, 36% eram de cães sem raça definida (SRD), 30% da raça Pit Bull, 7% Boxer, 5% Poodle e a minoria de casos ocorreu nas raças Pastor Canadense, Bull terrier, Lhasa apso, Dachshund, Dálmata, Dogue, Cocker e Fila Brasileiro com 1 caso cada, o que representou 2% cada. Dois casos não forneceram informação sobre a raça representando 5% das amostras. Quanto ao sexo, observou-se que as fêmeas eram maioria, com 61% e os machos representaram 34% dos casos. Dois casos não tinham a informação sobre o sexo, o que representou 5% das amostras. A idade variou de quatro a 14 anos com uma média de oito anos. As lesões encontraram-se distribuídas principalmente no tronco, correspondente a 43,18% do total dos casos, 20,45% em cabeça e 18,18% em membros. Oito casos não forneceram informação sobre local do tumor representando 18,18% das amostras. Os casos de CCE cutâneo incluídos no estudo estão resumidos no anexo A.

Análise histológica

A análise histológica das lesões mostrou que, classificando os CCEs cutâneos em três graus de diferenciação, 25 % dos casos eram bem diferenciados, 52% moderadamente diferenciados e 23% pouco diferenciados. Considerando dois graus de diferenciação, encontrou-se que 77% eram bem diferenciados e 23% pouco diferenciados.

Os CCE bem diferenciados apresentavam cordões compactos e ilhas de células epiteliais de variados tamanhos que tendiam à queratinização com a formação de pérolas de queratina lamelada (figura 4 A e B). As células em proliferação revelaram moderado pleomorfismo celular, grandes núcleos vesiculares, nucléolos proeminentes, atividade mitótica variável e presença de pontes intercelulares.

Os CCEs moderadamente diferenciados mostraram características semelhantes com o bem diferenciado, observando-se atividade mitótica proeminente e menor queratinização em comparação com o estágio diferenciado.

Os pouco diferenciados mostraram-se como ilhas, sem formação de cordões e com ocasionais arranjos de células em espiral com moderado a elevado grau de anaplasia celular, pleomorfismo e atividade mitótica; com produção de queratina notavelmente reduzida (figura 5 A e B).

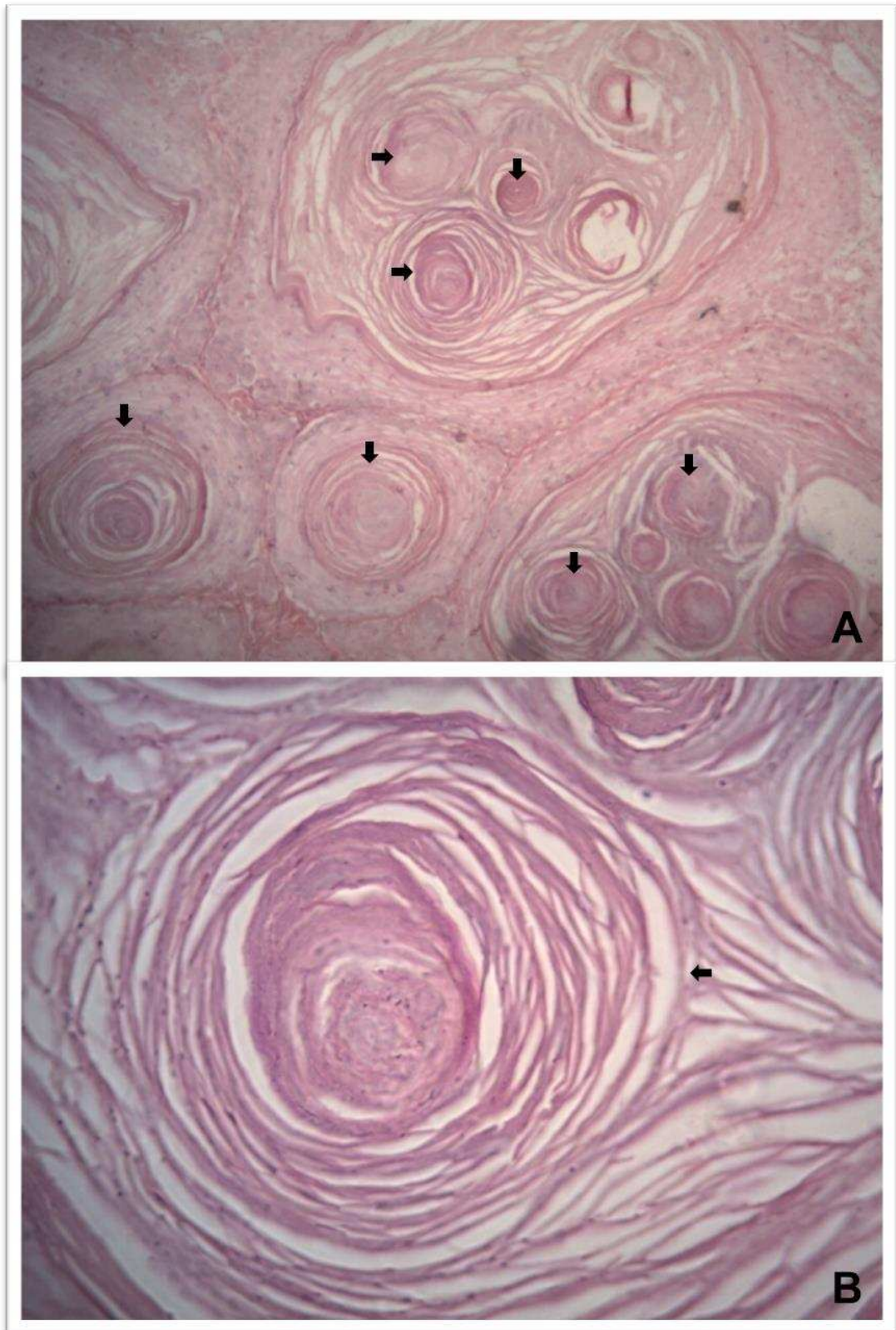


Figura 4. CCE cutâneo bem diferenciado. A. Notar as pérolas de queratina em abundância. (setas pretas). H&E, 10X. B. Destaque de uma pérola de queratina (seta preta). H&E, 40X.

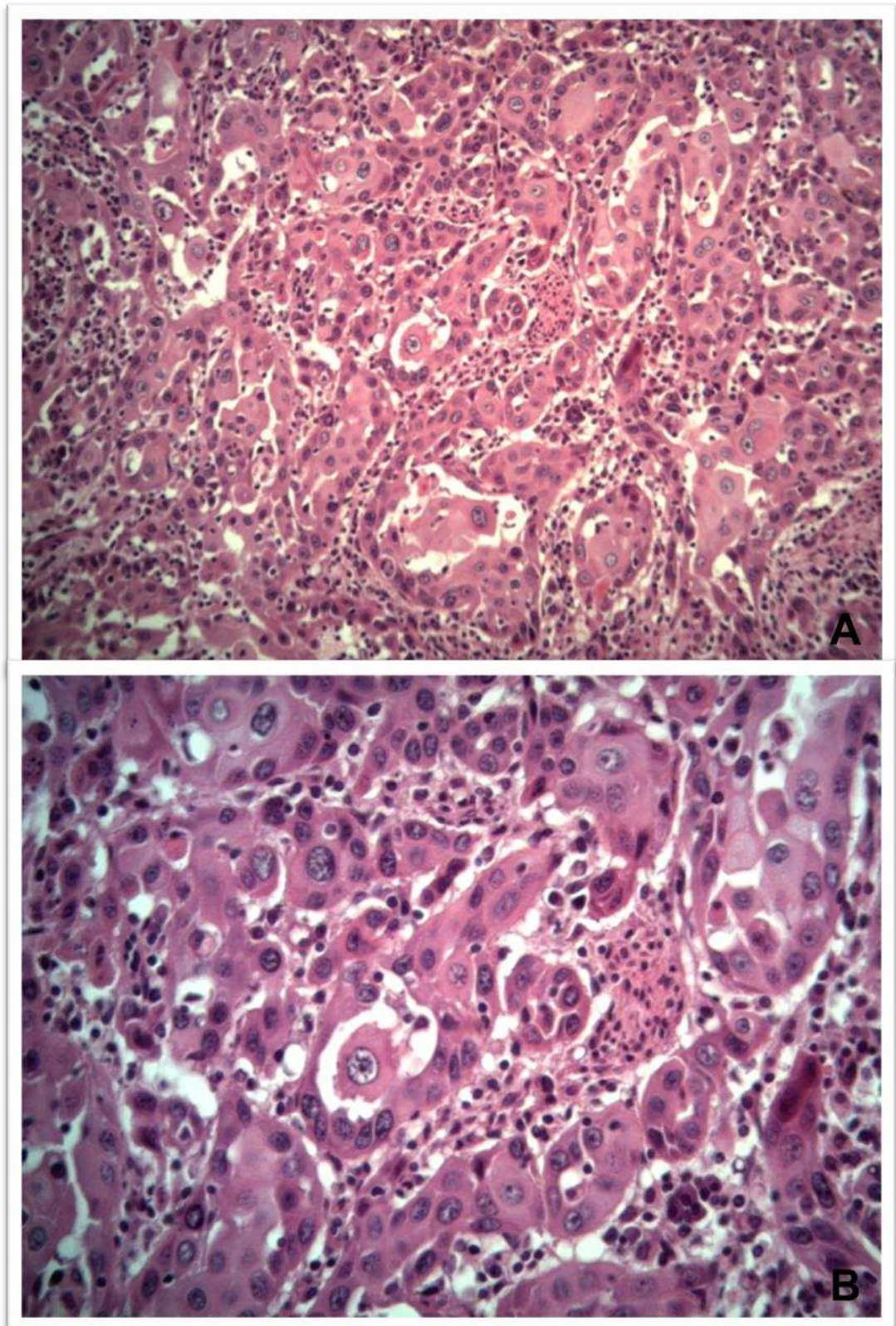


Figura 5. A. CCE cutâneo pouco diferenciado. Observa-se anaplasia, pleomorfismo com produção de queratina notavelmente reduzida, H/E, 20X. B. Destaque da lâmina A. H&E, 40X.

Distribuição dos CCEs cutâneos segundo a região do corpo

Quando classificados em três graus de diferenciação, os CCEs apresentaram distribuição similar na cabeça, nos membros e no tronco dos animais acometidos ($p=0,196$) (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos CCEs classificados em três graus de diferenciação segundo a região do corpo.

Grau de diferenciação	Cabeça	Membro	Tronco
Bem diferenciado	0,00%	5,56%	16,67%
Moderadamente diferenciado	13,89%	11,11%	30,56%
Pouco diferenciado	11,11%	5,56%	5,56%

* Amostras sem informação quanto a região do corpo foram excluídas desta análise. Não houve diferença estatística entre os grupos. Teste qui-quadrado, alfa=5%.

Segundo o teste do qui-quadrado, o grau de diferenciação tumoral variou segundo a região do corpo acometida sendo o CCE bem diferenciado mais frequente no tronco e o CCE pouco diferenciado, na cabeça ($p=0,010$), (tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos CCEs bem e pouco diferenciados segundo a região do corpo.

Grau de diferenciação	Cabeça	Membro	Tronco
Bem diferenciado	8,33%	13,89%	47,22%*
Pouco diferenciado	16,67%*	8,33%	5,56%

* Amostras sem informação quanto a região do corpo foram excluídas desta análise. Os asteriscos indicam localizações que apresentaram diferença estatística. Teste qui-quadrado, alfa=5%.

Caracterização de colágeno tipo I e III

O método PR/P permitiu a visualização do colágeno tipo I mostrando marcada birrefringência laranja e vermelha. Percebeu-se que as fibras colágenas do tipo I eram dominantes, estavam distribuídas irregularmente e dispostas como grandes bandas de diferentes comprimentos que separavam os cordões compactos ou ninhos que com frequência rodeavam parcial ou descontinuamente a área neoplásica. Havia desorganização e fragmentação acentuada das fibras colágenas do tipo I nos diferentes graus de diferenciação tumoral, sendo menos marcada nos CCE bem diferenciados (figura 6 e 7).

As fibras colágenas tipo III distribuíram-se por áreas escassas de birrefringência verde amarelado e verde nos diferentes graus de diferenciação tumoral. Foram observadas em pouca quantidade, com tamanhos e formas variadas distribuídas no estroma neoplásico (figura 7).

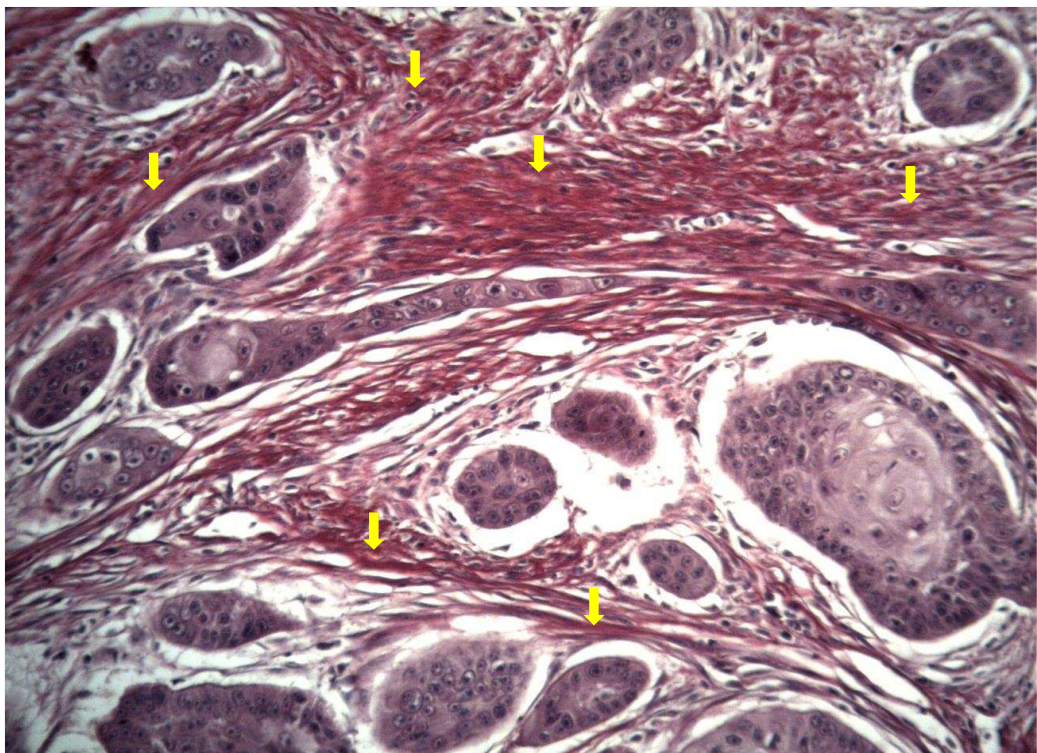


Figura 6. Picrosirius Red/ sem polarização. Mostram-se as fibras colágenas rodeando as células tumorais (Setas) 40X.

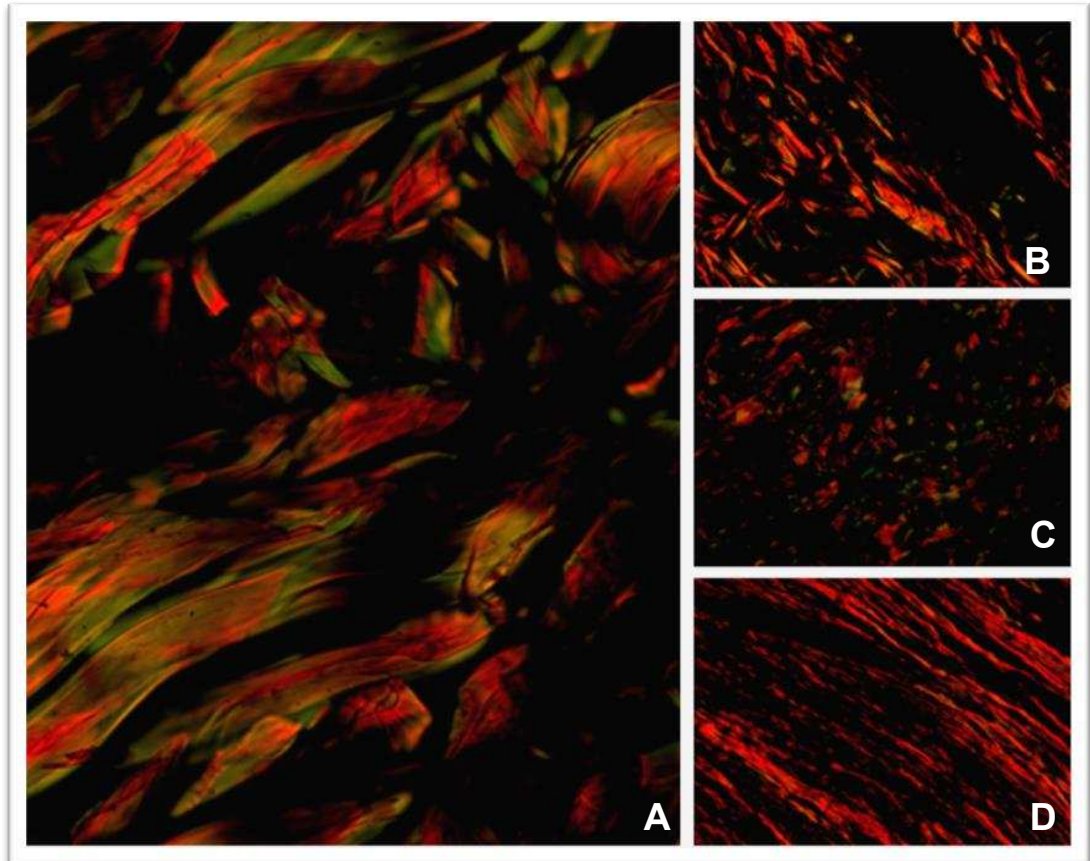


Figura 7. Fibras colágenas tipo I (cor vermelha) e III (cor verde) com Picrosirius red/ com polarização. A. Pele normal. B. CEC cutâneo bem diferenciado com presença de fibras colágenas tipo I e tipo III. C. Moderadamente diferenciado com fibras colágenas tipo I e III. D) Pouco diferenciado com predomínio de colágeno tipo I. PR/P, 40X.

Expressão de colágenos do tipo I e III utilizando três graus de diferenciação

A análise dos dados utilizando três graus de diferenciação tumoral revelou que não há diferença estatística entre a quantidade de colágeno do tipo I e III no presente trabalho ($p=0,864$ e $p=0,451$, respectivamente). O desvio padrão dos dados indica que há grande variação entre amostras na expressão de ambos os tipos de colágeno (figura 8).

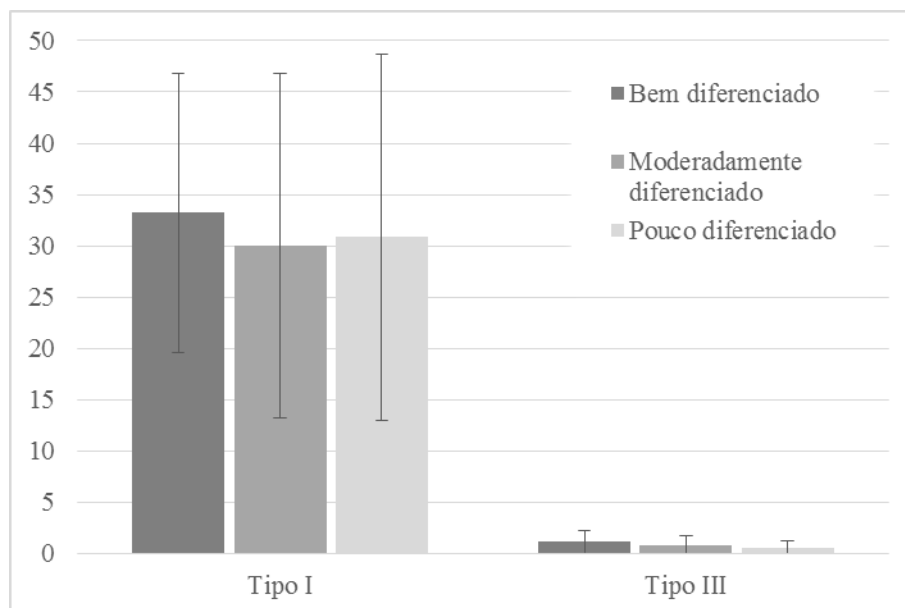


Figura 8. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo o grau de diferenciação das amostras. Teste ANOVA e Teste Kruskal-Wallis, $\alpha = 5\%$.

Expressão de colágenos do tipo I e III utilizando dois graus de diferenciação

Ao considerar dois graus de diferenciação tumoral, a análise dos dados revelou que não há diferença estatística entre a expressão de colágeno do tipo I nos carcinomas diferenciados e pouco diferenciados ($p=0,708$). Entretanto, o colágeno do tipo III é expresso em maior quantidade nos carcinomas diferenciados ($p=0,037$) (figura 9).

Expressão de colágenos segundo a localização do tumor

Considerando a distribuição dos tipos de colágeno segundo a região do corpo, o tipo I não apresentou diferença estatística ($p=0,556$) entre cabeça, tronco e membros. Entretanto, para o colágeno do tipo III, a análise revelou que a quantidade expressa no tronco é significativamente maior que no membro ($p=0,003$) (Figura 10).

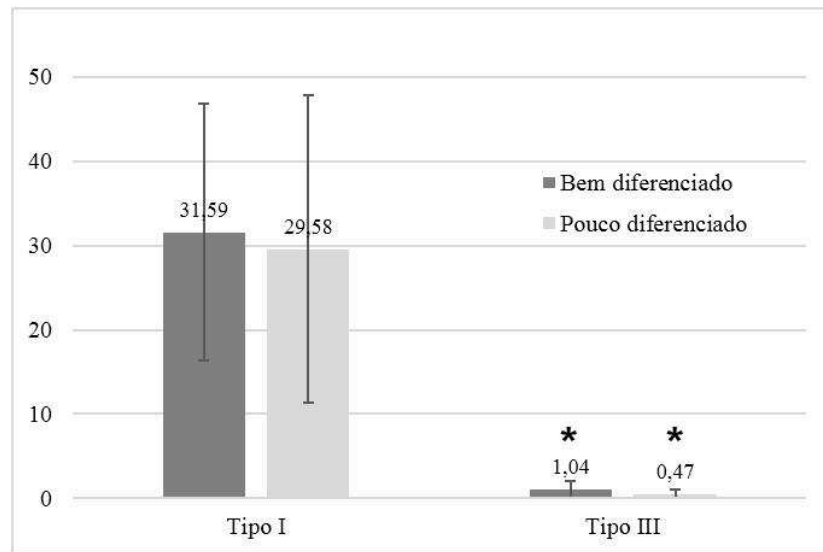


Figura 9. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo o grau de diferenciação das amostras. Os asteriscos indicam os pares que apresentaram diferença estatística no Teste t de Student e Teste Mann-Whitney, $\alpha = 5\%$.

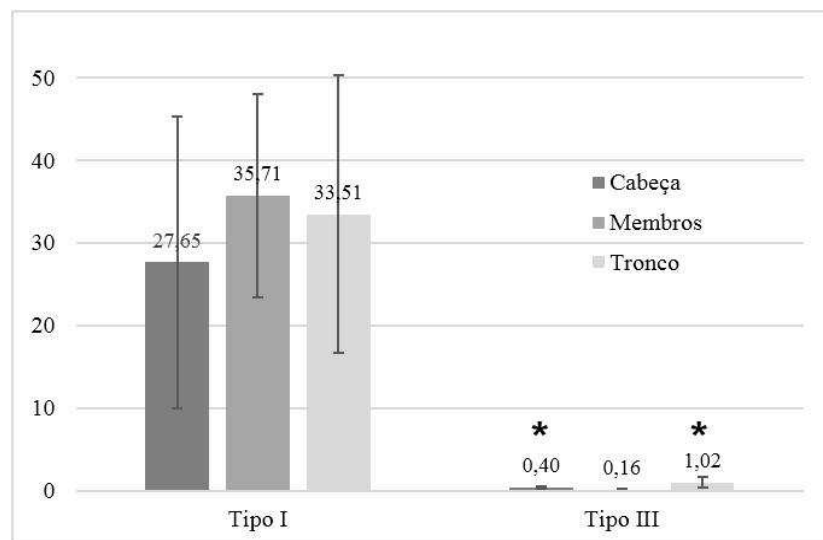


Figura 10. Representação gráfica das médias e dos desvios-padrão da porcentagem de colágeno do tipo I e III segundo a região do corpo acometida. Os asteriscos indicam os pares que apresentaram diferença estatística nos testes de Kruskal-Wallis e Dunn, $\alpha = 5\%$.

4. DISCUSSÃO

Torna-se cada vez mais claro que o câncer não resulta apenas do crescimento descontrolado de uma única célula, mas que envolve múltiplas disfunções nas interações entre diferentes tipos de celulares e da MEC (Kim *et al.*, 2011). Esta interação é essencial na iniciação, progressão e atividade metastática do câncer (Fuentes *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011).

O colágeno nos tecidos representa uma barreira física contra a invasão tumoral e sua arquitetura é severamente alterada nos tumores (Egeblad *et al.*, 2010). Após a iniciação do tumor muitas das fibras colágenas engrossam progressivamente e se linearizam. Esta linearização é mais notável nas áreas adjacentes à vasculatura do tumor e nas áreas com células cancerígenas (Provenzano *et al.*, 2006). Esta reestruturação física do colágeno intersticial endurece progressivamente a MEC, que posteriormente provoca diversos efeitos sobre a diferenciação celular, expressão gênica, a proliferação, sobrevivência e migração das células cancerígenas (Egeblad *et al.*, 2010).

A proteólise da MEC é fortemente controlada em tecidos normais, mas tipicamente desregulada em tumores. A degradação do colágeno por proteases, incluindo catepsinas e metaloproteinases (MMPs) é importante para a invasão da célula cancerígena, gerando vias para que as células migrem através da MEC. A clivagem do colágeno do tipo I por MMP1, -8, -13 e -14 (MT1-MMP) resulta na geração de fragmentos que possuem cerca de 1/4 e 3/4 do comprimento da molécula colagênica nativa. Esses fragmentos podem atuar como antagonistas de colágeno com comprimento normal porque se ligam, mas não conseguem ativar a integrina $\alpha 2\beta 1$. No entanto, estes fragmentos podem promover a migração celular e sobrevivência ativando integrina $\alpha v\beta 3$. (Egeblad *et al.*, 2010).

Na análise das fibras colágenas do estroma de CCE cutâneo de cães com o método PR/P observou-se que havia fragmentação acentuada e desorganização das fibras colágenas, especialmente do tipo I nos diferentes graus de diferenciação tumoral, sendo menos marcada nos CCE bem diferenciados. A desorganização das fibras colágenas observada neste estudo coincide com os resultados obtidos no estudo realizado por Martins *et al* (2002)

em neoplasias mamárias benignas e malignas em cães, onde as fibras colágenas encontravam-se distribuídas irregularmente no estroma de carcinomas e de uma forma mais ordenada e regular nos tumores benignos.

Na pele normal, os colágenos tipo I e tipo III predomina na derme, representando 87% e 10% do colágeno dérmico, respectivamente (Miller *et al.*, 2013). Neste estudo, o colágeno predominante foi o colágeno tipo I em todos os graus de diferenciação tumoral. No entanto, ao considerar dois e três graus de diferenciação não foi encontrada diferença estatística na quantidade de colágeno tipo I, observando-se uma grande variabilidade dos dados. Esta variabilidade poder ser explicada pelas diferenças encontradas na análise histopatológica dos casos estudados, que apresentavam áreas com pouca ou alta celularidade organizadas em ilhas, cordões, trabéculas e aglomerados de células epiteliais de diversos tamanhos e formas distribuídas irregularmente, assim como a presença de acantólise de alguns casos no estroma de CCE cutâneo.

Em diversos estudos o colágeno tipo I mostrou que é o componente estrutural mais abundante em tumores sólidos e é altamente expressado em tumores invasivos e metastáticos (Cheng e Leung, 2011). Este tipo de colágeno produz-se amplamente no estroma de carcinoma de pâncreas, próstata, ovário e estômago em humanos (Koenig *et al.*, 2006; Docheva *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010, Cheng e Leung, 2011). Sua presença reduz a adesão celular e aumenta a proliferação tumoral, migração celular e invasão (Koenig *et al.*, 2006; Cheng e Leung, 2011).

Quando foram considerados dois graus de diferenciação tumoral, encontrou-se que o colágeno tipo III se expressa em maior quantidade nos CCEs cutâneos bem diferenciados em comparação aos CCEs pouco diferenciados. Estes resultados mostram similaridade com um estudo realizado por Samar *et al.* (2012), em glândulas salivares de humanos, onde foi observado o predomínio do colágeno tipo I em tumores malignos, e colágeno tipo III em tumores benignos. Ainda que o CCE cutâneo bem diferenciado não seja uma neoplasia benigna, o prognóstico é muito melhor quando comparado com um CCE de menor grau de diferenciação histológica, o qual apresenta maior probabilidade de recidivas, ocorrência de metástases e pior prognóstico (Rodaski & Werner, 2009; Yanofsky *et al.*, 2011). No entanto, Cardona *et al.*

(2013) encontraram presença moderada de colágeno maduro tipo I e ausência do tipo III em CCE cutâneo bem diferenciado em bovinos. Estes mesmos autores sugeriram que isto poderia indicar a escassa resposta regenerativa do organismo frente ao processo de progressão das células cancerígenas.

Fuentes *et al.* (2012) realizaram um estudo para determinar as mudanças progressivas na lâmina basal e remodelação do tecido conjuntivo durante a carcinogênese induzida com 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) em ratos. Estes autores observaram uma destruição progressiva da membrana basal e desorganização do colágeno tipo I no tecido conjuntivo, assim como mudanças na composição do colágeno foram evidentes. Neste estudo, o colágeno tipo I estava diminuído e foi substituído por fibras colágenas finas tipo III em displasia severa e CCE oral. De um modo semelhante Allon *et al.* (2006), em seu estudo sobre diferenças estromais em tumores de glândula salivar, encontraram que 50% das fibras de colágeno em adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico era colágeno tipo III, enquanto que no adenoma pleomórfico (neoplasia benigna) apenas 13% era colágeno tipo III. Os autores sugeriram que as fibras colágenas estavam ligeiramente comprimidas em tumores salivares mais agressivos, constituído provavelmente por colágeno III, intermédio ou colágeno patológico o que facilitaria a invasão a tecidos adjacentes e o desenvolvimento de metástases. Estas alterações na composição das fibras de colágeno representam uma grande desorganização do esqueleto básico da MEC. Os resultados destes estudos diferem dos nossos, já que proporção de colágeno tipo I é predominante em todos os graus de diferenciação tumoral e o colágeno tipo III vai diminuindo a medida que se perde o grau de diferenciação tumoral.

O papel do colágeno do tipo III nas neoplasias não está bem esclarecido e existem outros fatores que podem ser empregados na determinação do grau de malignidade de uma neoplasia, além do grau de diferenciação e esses outros fatores poderiam também influenciar na expressão de colágeno, de forma que outros estudos podem ser necessários com um número maior de amostras para inclusão de outras variáveis que permitam obter resultados mais conclusivos que contribuam no diagnóstico, prognóstico e tratamento.

5. CONCLUSÃO

- Alterações da composição e distribuição das fibras colágenas no estroma de CCE cutâneo em cães foram evidenciadas com PR/P.
- Houve predomínio do colágeno tipo I nos diferentes graus de diferenciação tumoral, porém não há diferença estatística entre a expressão deste tipo de colágeno.
- Os resultados deste estudo mostraram que há maior expressão de colágeno tipo III nos CCE cutâneos bem diferenciados que nos CCE cutâneos pouco diferenciados, porém, isto só foi evidente quando as amostras foram classificadas em apenas dois graus de diferenciação: bem diferenciadas ou pouco diferenciadas.

REFERÊNCIAS

ALLON, I.; VERED, M.; BUCHNER A.; DAYAN, D. Stromal differences in salivary glands tumors of a common histopathogenesis but with different biological behavior. **Acta Histochemica.**, v.108, n. 4, p. 259-64, 2006.

ARAÚJO, V.; DEMASI, A.; FURUSE, C.; ALTEMANI, A.; ALVES, V.; FREITAS, L.; ARAUJO, N. Collagen type I may influence the expression of E-cadherin and beta-catenin in carcinomaex-pleomorphic adenoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v 17, p 312- 318, 2009.

BARBOSA, J.; DUARTE, M.; OLIVEIRA, C.; REIS, A.; PEIXOTO, T.; PEIXOTO, P.; BRITO, M. Carcinoma de células escamosas perineal em cabras no Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 421-427, 2009.

CARDONA, J. A.; VARGAS, M.I.; PERDOMO, S.C. Estudio Clínico e Histopatológico del Carcinoma de Células Escamosas de Bovinos en el Departamento de Córdoba, Colombia. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela**, v. 54,n 2, p. 68-77, 2013.

CHANDRASHEKARAI AH G.B.; RAO, S; MUNIVENKATAPPA, B. S.; MATHUR, K. Y. Canine Squamous Cell Carcinoma: a Review of 17 Cases. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n. 2, p. 79-86, 2011.

CHENG, J.C.; LEUNG, P.C. Type I collagen down-regulates E-cadherin expression by increasing PI3KCA in cancer cells. **Cancer Letters**, v. 304, p. 107- 233, 2011.

COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. **Acta histochemical**, v 113, p. 231–233, 2011.

DOCHEVA, D.; PADULA, D.; SCHIEKER, M.; CLAUSEN-SCHAUMANN H. Effect of collagen I and fibronectin on the adhesion, elasticity and cytoskeletal organization of prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, p. 361–366, 2010.

EGEBLAD, M.; RASCH, M.G.; WEAVER, VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 5, p. 697–706, 2010.

FUENTES, B.; DUASO, J.; DROGUETT, D.; CASTILLO, C.; DONOSO, W.; RIVERA, C.; VENEGAS, B.; KEMMERLING, U. Progressive Extracellular Matrix Disorganization in

Chemically Induced Murine Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Scholarly Research Network**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

IWASAKI, S; YOSHIZAWA, H; AOYAGI, H. Localization of type III collagen in the lingual mucosa of rats during the morphogenesis of circumvallate papillae. **Odontology**, v.100, p. 10–21, 2012.

JUNQUEIRA L.C.U.; MONTES G.S.; MARTINS J.E.C.; JOAZEIRO, P.P. Dermal collagen distribution. **A histochemical and ultrastructural study**. *Histochemistry*, 79 : 397-403, 1983.

KAKKAD,S.M.; SOLAIYAPPAN, M.; ARGANI, P.; SUKUMAR, S.; JACOBS, L.K.; LEIBFRITZ, D.; BHUJWALLA, Z.M.; GLUNDE. Collagen I fiber density increases in lymph node positive breast cancers: pilot study. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n. 11, 2012.

KIM, S. H.; JEREMY TURNBULL, J.; GUIMOND, S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. **Journal of Endocrinology**, v. 209, p. 139–151, 2011.

KOENING, A.; MUELLER, C.; HASEL, C.; ADLER, G; MENKE, A. Collagen type I induces disruption of Ecadherin- mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 4662-4671, 2006.

KOREN, R.; YANIV, E.; KRISTT D.; SHVERO, J.; VELTMAN, V.; GRUSHKOI. Capsular collagen staining of follicular thyroid neoplasms by picosirius red: Role in differential diagnosis. **Acta Histochemica**, v.103, p. 151–7, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. ROBBINS & COTRAN - **Patologia bases patológicas das doenças**. Rio de janeiro: Elsevier, 2010. p. 79-110.

LI, A.; ZHOU, T.; GUO, L.; SI, J. Collagen type I regulates β -catenin tyrosine phosphorylation and nuclear translocation to promote migration and proliferation of gastric carcinoma cells. **Oncology reports**, v. 23, p. 1247-1255, 2010.

LIN, Q.; YUN, Z. Impact of the hypoxic tumor microenvironment on the regulation of cancer stem cell characteristics. **Cancer Biology & Therapy**, v. 9, n.12, p. 949-956, 2010.

LINSENMEYER, T.F. **Cell biology of extracellular matrix**. New York: Plenum Press. 1991. p. 7-44.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1-24, 2011.

MARTINS, A.M.C.R.P.F.; TAMASO, E.; GUERRA, J.L. Histochemical study of fibrillar proteins of the extracellular matrix in benign and malignant mammary neoplasms in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p. 43-49, 2002.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 7th edith : Elsevier, 2013. P. 774 – 843.

MONTES, G.S. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**, v, 20, n. 1, p. 15–27, 1996.

MORO, L.; ARBINI, A.A.; MARRA, E.; GRECO, M. Down-regulation of BRCA2 Expression by Collagen Type I Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation. **The journal of biological chemistry**, v. 280, n. 23, 2010.

MOUW, J.K.; OU G.; WEAVER, V. M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Molecular cell biology**, v. 15, p. 771-785, 2014.

PROVENZANO, P.P.; ELICEIRI, K.W.; CAMPBELL, J.M.; INMAN, D.R.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. **BMC Medicine**, p. 4-38, 2006.

PROVENZANO, P.P.; INMAN, D.R.; ELICEIRI, K.W.; KNITTEL, J.G; YAN, L.; RUEDEN, CT.; WHITE, J.G.; KEELY, P.J. Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. **BMC Medicine**, p. 6 - 11. 2008.

RAMOS, A.; NORT, D.; ELIASI, F.; FERNANDES, C. Carcinoma de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos: estudo de 50 casos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, p. 5-13, 2007.

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

ROSS, M.H.; REITH, E.J.; ROMRELL, L.J.; Tecido conjuntivo. In: 2ed. **Histologia: texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, Cap.2, p.85-115.

SAMAR, M. E.; VILA, R. E.; ASIS, O. G.; FONSECA, I. & CORBALL, A. Identification of type I and III collagen by picosirius red/ polarization of tumoral salivary stroma. **International journal of odontostomatology**, v. 6, n. 1, p. 59-64, 2012.

SWEAT, F.; PUCHTLER, H.; ROSENTHAL, SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 78, p. 69–72, 1964.

VERHAEGEN, P.D.; SCHOUTEN, H.J.; TIGCHELAAR-GUTTER; W.; VAN MARLE; J.; VAN NOORDEN, C.J.; MIDDELKOOP, E.; VAN ZUIJLEN, P.P. Adaptation of the dermal collagen structure of human skin and scar tissue in response to stretch: An experimental study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, p. 658–666, 2012.

WEATHERFORD, TW. Staining of collagenous and non-collagen structures with picosirius red F3BA. **Journal of Medical Sciences**, v. 9, p. 383- 8, 1972.

WHO. International Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin of Domestic Animals. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 3, p. 106, 1998.

YANOFSKY, V.R.; MERCER, S.E.; PHELPS, R.G. Histopathological Variants of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review. **Journal of Skin Cancer**, v. 2011, p. 1-13, 2011.

ANEXO

Anexo A.

CASO	RAÇA	IDADE	SEXO	LOCAL DA NEOPLASIA	GRAU DE DIF. CELULAR	
					Três	Dois
1	Dogu	5	F	Membro pélvico	Moderado	Bem
2	Cocker	12	M	Nariz	Pouco	Pouco
3	SD	SD	F	Lábio vulvar	Moderado	Bem
4	SRD	13	F	Membro pélvico (dígito)	Pouco	Pouco
5	SRD	4	F	SD	Bem	Bem
6	SRD	12	M	Nariz	Pouco	Pouco
7	SRD	6	F	Pavilhão auricular	Moderado	Bem
8	SRD	9	M	Pavilhão auricular	Moderado	Bem
9	SRD	SD	F	SD	Moderado	Bem
10	SRD	5	M	Membro torácico	Bem	Bem
11	SRD	11	F	SD	Moderado	Bem
12	P. Canadense	8	F	Membro pélvico	Moderado	Bem
13	SRD	9	F	Nariz	Moderado	Bem
14	Pit Bull	9	M	Prepúcio	Moderado	Bem
15	SD	SD	SD	Lábio	Moderado	Bem
16	Pit Bull	5	F	Abdômen	Bem	Bem
17	Bull terrier	8	M	Prepúcio	Bem	Bem
18	Lhasa apso	10	F	Membro torácico	Pouco	Pouco
19	Pit Bull	6	F	SD	Bem	Bem
20	SRD	14	M	Lábio	Moderado	Bem
21	Pit Bull	6	F	Abdômen	Moderado	Bem
22	Dachshund	8	F	Membro pélvico (dígito)	Moderado	Bem
23	Boxer	8	M	Bolsa escrotal	Moderado	Bem
24	Boxer	10	F	Tórax	Bem	Bem
25	Poodle	8	F	Abdômen	Pouco	Pouco
26	SRD	12	M	Membro torácico	Bem	Bem
27	Poodle	10	F	SD	Pouco	Pouco
28	Pit Bull	7	F	Região abdominal	Bem	Bem
29	Pit Bull	4	F	SD	Moderado	Bem
30	Dálmata	8	F	SD	Bem	Bem
31	SRD	9	F	Face	Pouco	Pouco
32	Pit Bull	8	F	Abdômen	Moderado	Bem
33	Pit Bull	8	M	Prepúcio	Moderado	Bem
34	Boxer	11	F	Abdômen	Moderado	Bem
35	Pit Bull	8	M	Abdômen	Moderado	Bem
36	Pit Bull	4	F	Abdômen	Moderado	Bem
37	SRD	8	M	SD	Pouco	Pouco
38	SRD	SD	F	Abdômen	Bem	Bem
39	SRD	10	M	Escroto	Moderado	Bem
40	SRD	SD	F	Pálpebra	Pouco	Pouco
41	Pit Bull	8	M	Abdômen	Bem	Bem
42	Fila	8	SD	Membro pélvico	Moderado	Bem
43	Pit Bull	11	F	Abdômen	Pouco	Pouco
44	Pit Bull	12	M	Prepúcio	Moderado	Bem

SRD: sem raça definida, SD: sem dados.