



[T]

Caracterização dos parâmetros morfológicos e expressão de p53, e-caderina e metaloproteinases 2 e 9 em carcinoma de células escamosas de cães

[I]

Characterization of morphological parameters and expression of p53, e-cadherin and matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine squamous cell carcinoma

[A]

Paula Mayumi Ono^[a], Juliany Gomes Quitzan^[b], Liv Cristina Miara^[c], Cristina Santos Sotomaio^[d]

[a] Médica-veterinária, Mestre pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: paulinha_simi@hotmail.com

[b] Médica-veterinária, Doutora; professora da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: juliany.quitzan@pucpr.br

[c] Médica-veterinária, Mestre; professora da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: liv.miara@pucpr.br

[d] Médica-veterinária, Doutora; professora da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: cristina.sotomaio@pucpr.br

Resumo

Com o objetivo de caracterizar os parâmetros morfológicos, determinar o grau de malignidade e avaliar a expressão da p53, e-caderina e metaloproteinases -2 e -9 em carcinomas de células escamosas (CCEs) de cães, foi realizado um estudo retrospectivo dos casos de CCEs de cães de 1996 a 2009 do Laboratório de Patologia Animal na Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Foram selecionadas 13 amostras de CCEs de cães, dentro de um total de 63 amostras de CCE de animais domésticos. Os parâmetros morfológicos analisados foram: pleomorfismo nuclear e celular, número de mitoses, presença de pérolas de queratina, pontes intercelulares, cordões ou fileiras, população densa de células neoplásicas, estroma, metaplasia, estágio de invasão e tipo de infiltrado inflamatório. Dos 13 tumores, 38,5% foram classificados como bem diferenciados, 38,5% como moderadamente diferenciados e 11% como pouco diferenciados. O principal parâmetro utilizado para caracterizar os CCEs foi o pleomorfismo celular e nuclear, que se manteve consistente com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), divergindo somente em 7,7% das amostras. Outros parâmetros, como número de mitoses, pérolas de queratina e pontes intercelulares, apresentaram divergências em 23-46% das amostras analisadas. Em relação às MMP-2 e -9, quatro amostras apresentaram imunexpressão para ambas as metaloproteinases, e em três amostras foi observada a ausência da expressão. As divergências encontradas podem indicar a necessidade de análises mais precisas desses parâmetros morfológicos para a classificação de CCE em cães. Dentre as sete amostras analisadas pela imuno-histoquímica, em nenhuma foi observada a expressão das proteínas p53 e e-caderina. As MMP-2 e -9 parecem apresentar um papel importante no comportamento agressivo no carcinoma de células escamosas e o emprego desses

marcadores na rotina da histopatologia veterinária poderia servir como indicador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas em cães.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Histologia. Imuno-histoquímica. MMP-2. MMP-9.

Abstract

The present study intended to characterize cell morphological parameters, the degree of carcinoma malignancy, the expression of p53, E-cadherin and matrix metalloproteinases -2 and -9 in squamous cell carcinoma (SCC) cases from dogs. The material was collected from the archives – samples from 1996 to 2009 – of the Laboratory of Animal Pathology at the Catholic University of Parana. From a total of 63 SCC samples collected from domestic animals, 13 were used. The morphological parameters analyzed were: nuclear and cellular pleomorphism; number of mitoses; presence of keratin pearls, intercellular bridges, strings or rows, dense population of neoplastic cells, stroma, metaplasia; stage of invasion; and type of inflammatory infiltrate. Out of the 13 tumors analyzed, 38.5% were classified as well differentiated, 38.5% as moderately differentiated and 11% as poorly differentiated. The main parameter used to characterize the SCCs was the cellular and nuclear pleomorphism, which remained consistent with the classification of the World Health Organization (WHO), differing in only 7.7% of the samples. Other parameters such as the number of mitoses, keratin pearls and intercellular bridges were alterations found in 23-46% of the samples. Out of the seven samples analyzed by immunohistochemistry, no expression of p53 and E-cadherin was observed. In addition, four samples showed immunoreactivity for MMP-2 and -9 and three samples showed lack of MMP expression. The divergences may indicate the need for more accurate analysis of morphological parameters for the classification of SCC in dogs. MMP-2 and -9 appear to play an important role in aggressive behavior of SCCs and the use of these markers in routine veterinary histopathology could serve as a prognostic indicator for squamous cell carcinoma in dogs.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Histology. Immunohistochemistry. MMP-2. MMP-9.

Introdução

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um neoplasma maligno da epiderme, relativamente comum em humanos e animais, podendo ter ampla variedade de formas clínicas, sendo sua origem os queratinócitos (PARADIS et al., 1989).

A etiologia do CCE não é clara nem pode ser definida em todos os casos (SCOTT et al., 2001). Sabe-se que as neoplasias cutâneas desenvolvem-se secundariamente às alterações moleculares que causam danos ao DNA, como a radiação ultravioleta (UV), apontada como principal causa do aparecimento de CCE (HARGIS; GINN, 2007). Esse tipo de neoplasma ocorre com mais frequência nas áreas com maior exposição solar e pode ser precedido por uma queratose actínica. Observa-se elevada incidência em animais com pouco pelo, pele despigmentada ou levemente pigmentada (SCOTT et al., 2001).

A classificação histológica dos CCEs é realizada utilizando-se um sistema de gradação de acordo com critérios de malignidade presentes nas células neoplásicas. Essa classificação foi desenvolvida por Weiss e Frese (1974) e publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Uma segunda classificação foi, então, proposta pela OMS (1998), e é utilizada até os dias atuais, descrevendo-se o carcinoma de células escamosas multicêntrico *in situ*, o carcinoma de células escamosas do leito ungueal e o carcinoma de células escamosas.

A imuno-histoquímica (IHQ) pode ser utilizada como auxílio na classificação de diversos tumores em medicina veterinária (POWERS, 2007). O uso da IHQ em patologia veterinária apresenta algumas limitações em função da falta de anticorpos espécie-específicos (RUIZ et al., 2005). Os anticorpos utilizados para o diagnóstico de CCE nos animais domésticos são: p53, Ki-67, e-caderina, ciclina A e ciclina D₁ (CARVALHO et al. 2005; JOÃO, 2008; MURAKAMI et al., 2000).

Alterações no gene TP53 têm sido reportadas em tumores mamários (MAYR et al., 1998), osteossarcomas (MENDOZA et al., 1998), linfomas (VELDHOEN et al., 1998) e tumores de pele (MAYR et al., 1999). Teifke e Löhr (1996) analisaram imuno-histoquimicamente a expressão da proteína p53 mutante e encontraram 28% de imunopositividade em CCEs de cães. Esses resultados fornecem respaldo para a visão de que, assim como no homem, a superexpressão da proteína p53 tem um importante papel no desenvolvimento de muitos carcinomas espinocelulares na espécie canina, o que provavelmente decorre da radiação ultravioleta.

Em medicina veterinária, alterações envolvendo a e-caderina foram reportadas em neoplasias mamárias de cadelas (ZUCCARI et al., 2008), tumores testiculares caninos (OWSTON; RAMOS-VARA, 2007), carcinoma de células escamosas e tumores de células basais em cães (JOÃO, 2008). A expressão reduzida da e-caderina pode afetar a adesão celular, permitindo ou aumentando o risco da progressão tumoral; dessa forma, é facilitada a diferenciação tumoral, o aumento da invasão e o desenvolvimento de metástase (BIRCHMEIER; BEHRENS, 1994; JIANG, 1996).

As metaloproteinases (MMPs) fazem parte de uma família de endopeptidases que degradam a matriz extracelular (MEC). A degradação da MEC se constitui em um evento essencial em muitos processos fisiológicos, como durante o crescimento e o reparo dos tecidos. Por outro lado, sua excessiva degradação pode acarretar o desenvolvimento de várias condições patológicas, como as neoplasias (CHAMBERS; MATRISIAN, 1997; WESTERMARCK; KAHARI, 1999). As MMP-2 e -9 constituem o grupo das gelatinases, que recebe esta denominação por degradar o colágeno desnaturado (gelatina) e o colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal, a primeira barreira a fim de evitar a progressão de células epiteliais neoplásicas. Embora a evidência para o papel das MMPs em tumores de animais domésticos seja escassa, estudos envolvendo as MMPs -2 e -9 já foram descritos por Lana et al. (2000) em osteossarcoma canino, Leibman et al. (2000) em mastocitoma cutâneo canino, Papparella et al. (2002) em carcinomas mamários caninos e Mandara et al. (2009) em meningioma canino e felino.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros morfológicos encontrados nos CCEs de cães, a fim de determinar o grau de malignidade e

avaliar a expressão das proteínas p53, e-caderina e MMP-2 e -9.

Materiais e métodos

Foram utilizadas amostras de tumores obtidas no Laboratório de Patologia Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, abrangendo o período de 1996 a 2009. As amostras selecionadas foram catalogadas de acordo com a idade, o sexo, a raça e a localização da neoplasia, para posterior análise descritiva. Foram incluídas neste estudo somente as amostras de cães que possuíam lâmina e bloco correspondente.

Processamento e avaliação histológica

Os tumores estudados foram emblocados em parafina e reprocessados de acordo com o procedimento de rotina para histopatologia. Os parâmetros histopatológicos avaliados foram: presença de cordões ou fileiras, presença de população densa de células neoplásicas, presença de pontes intercelulares, presença de "pérolas de queratina", pleomorfismo, número de mitoses, tipo de infiltrado inflamatório, estágio de invasão, presença de estroma e presença de metaplasia.

A fim de quantificar o pleomorfismo nuclear e celular, o critério foi o mesmo utilizado por Bryne et al. (1989): pouco pleomorfismo nuclear representa mais de 75% de células maduras; moderado pleomorfismo nuclear representa de 50% a 75% de células maduras; e alto pleomorfismo celular representa de 25% a 50% de células maduras. Para o número de pérolas de queratina e número de mitoses, o critério utilizado foi o mesmo de Anneroth e Hansen (1984): pouco, variando de zero a dois; moderado, variando de três a quatro; e numerosas, cinco ou mais.

O carcinoma de células escamosas foi dividido três categorias histológicas, segundo Weiss e Frese (1974), em publicação da OMS: tumores bem diferenciados, tumores moderadamente diferenciados e tumores pouco diferenciados. Quando o pleomorfismo nuclear foi reduzido, o tumor foi classificado como bem diferenciado; quando o pleomorfismo era moderado, o tumor foi classificado como moderadamente diferenciado; e, quando o

pleomorfismo foi alto, o tumor foi classificado como pouco diferenciado.

Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada no laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Processamento das amostras para imuno-histoquímica

A imunoexpressão das proteínas p53, e-caderina e MMP-2 e -9 foram obtidas por meio do método imunoenzimático da estreptoavidina-biotina-peroxidase. A diluição dos anticorpos foi estabelecida previamente pela titulação do anticorpo primário, chegando às diluições p53→1:200, e-caderina→1:100 e MMP-9→1:50. A MMP-2 é apresentada na sua forma pré-diluída. Para a incubação do anticorpo secundário e complexo terciário (estreptoavidina-biotina com peroxidase), utilizou-se o *Advanced*[®] (DAKO[®]). Para revelar a reação antígeno-anticorpo, as lâminas foram incubadas em cromógeno 3,3 - diaminobenzidina (diaminobenzidina DAB[®], DAKO[®]) em 1 ml de solução tampão, pH 7,4. Após a incubação, as lâminas foram submersas em solução tampão novamente, seguidas por lavagem em água corrente e água destilada. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris e montados em lâmina para análise em microscópio de luz.

Anticorpos

Os anticorpos utilizados foram o p53 (anticamundongo, monoclonal, DAKO[®]), e-caderina (anticamundongo, monoclonal, NOVOCASTRA[®]) e MMP-2 (anti-coelho, monoclonal, SPRING-BIOSCIENCE[®]) e MMP-9 (anticamundongo, monoclonal, SPRING-BIOSCIENCE[®]).

Análise quantitativa da expressão da p53, e-caderina e MMP-2 e -9

A análise das células imunopositivas para os anticorpos contra p53, e-caderina e MMP-2 e-9 foi

realizada com duas repetições em campos definidos e escolhidos aleatoriamente, sendo consideradas positivas somente marcações em núcleos e citoplasma, de coloração castanha, independente da intensidade da coloração, com suficiência para diferenciação entre positivo e negativo.

Em relação à p53, a quantificação imuno-histoquímica é obtida com a razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total de células tumorais, sendo aplicado o seguinte esquema: (0) < 1% de células marcadas; (1) 1-10% de células marcadas; (2) 11-50% de células marcadas; e (3) > 50% das células marcadas (IGGO et al., 1990).

Quanto à avaliação da e-caderina, as lâminas foram avaliadas de acordo com a presença ou a ausência de expressão. Analisando o padrão e a intensidade de marcação da expressão da e-caderina, as amostras são classificadas em quatro escores: (1) ausente; (2) heterogêneo focal; (3) homogêneo reduzido e (4) homogêneo forte. A porcentagem de células tumorais positivas para a e-caderina com expressão em membrana são classificadas também em quatro escores: (1) < 25%; (2) 26-50%; (3) 51-75%; (4) > 76% (LYAKHOVITSKY et al., 2004).

Para as MMP-2 e -9, a leitura das lâminas foi realizada sob microscopia óptica, com aumento de 200 e 400 vezes. Observou-se a presença ou não de MMP-2 e -9 nas amostras de carcinomas de células escamosas por meio da intensidade e da coloração. O resultado foi expresso em: (0), (+), (++) e (+++), de acordo com a quantidade de MMP-2 e -9 e a coloração encontradas (ausente, bege, castanho e castanho-escuro, respectivamente) (MORALES et al., 2007).

Resultados

Dentre o total de 3.686 amostras de tumores obtidas ao longo do período de 1996 e 2009, 63 (1,7%) eram de carcinoma de células escamosas de animais domésticos. Das 63 amostras de CCE, 27 (43%) eram de cães e somente 13 foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão mencionados anteriormente.

As raças de cães mais afetadas foram: boxer (23,08%), fox terrier, rotweiller, husky siberiano e fila brasileiro (7,69% cada). Os cães sem raça definida totalizaram 46,15% das amostras. A faixa etária

acometida variou de 2 a 13 anos, sendo a média de idade de 6,4 anos.

As fêmeas foram mais acometidas com CCEs (62%) do que os machos (38%), e o local de maior incidência do CCE em cães foi a região do abdômen (46,15%), incluindo a pele da região em volta da glândula mamária, seguido pela bolsa escrotal e membro pélvico (15,38% cada), pálpebra, pele da região cervical e leito ungueal do 3º dígito (7,69% cada).

De acordo com a classificação histológica dos 13 cães com CCE, 5 (38,5%) foram classificados como bem diferenciados, 5 (38,5%) como moderadamente diferenciados e 3 (23%) como pouco diferenciados.

Os parâmetros mais importantes na classificação foram: o pleomorfismo nuclear, as pérolas de queratina, as pontes intercelulares e o número de mitoses (Quadro 1). Em 92,3% das amostras, o parâmetro morfológico pleomorfismo nuclear e celular apresentou-se em conformidade com a classificação estabelecida pela OMS. Somente uma das amostras (7,7%), na qual o pleomorfismo nuclear foi considerado reduzido, foi classificada como carcinoma pouco diferenciado. De acordo com o parâmetro número de mitoses, 54% das amostras concordaram com

o descrito pela OMS e 46% dos resultados encontrados divergiram entre os grupos classificados. Das seis amostras que divergiram, somente uma apresentou diferença importante, pois havia menos de duas mitoses por campo, quando, na verdade, deveriam apresentar mais de cinco. Em relação ao parâmetro morfológico presença de pérolas de queratina, 23% das amostras analisadas apresentaram divergências quando classificadas de acordo com a OMS; nos tumores bem diferenciados, nos quais deveria haver numerosas pérolas de queratina, duas amostras variaram de pouca a moderada presença e, nos tumores pouco diferenciados, uma amostra apresentou numerosas pérolas de queratina. Já a presença de pontes intercelulares está relacionada à presença de pérolas de queratina, ou seja, quando estas se encontram em maior número, a presença de pontes intercelulares é mais evidente; e quando o número de pérolas é reduzido ou ausente, as pontes intercelulares não são evidentes, tornando-se aparentes ou, em alguns casos, encontram-se ausentes.

Os cinco tumores bem diferenciados foram assim classificados principalmente por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear reduzido, (2) número

Quadro 1 – Parâmetros utilizados para a classificação dos carcinomas de células escamosas (CCEs) de cães em 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996-2009

| Amostras | Pleomorfismo nuclear ¹ | Número de mitoses ¹ | Pérolas de queratina ² | Pontes intercelulares ¹ | Classificação |
|----------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 461 | Pouco | Pouco | Pouco | Pouco evidente | Bem diferenciado |
| 2028 | Pouco | Moderado | Numerosas | Evidente | Bem diferenciado |
| 675 | Pouco | Pouco | Numerosas | Evidente | Bem diferenciado |
| 3113 | Pouco | Pouco | Numerosas | Evidente | Bem diferenciado |
| 576 | Pouco | Pouco | Moderado | Pouco evidente | Bem diferenciado |
| 3620 | Moderado | Pouco | Moderado | Evidente | Mod. diferenciado |
| 1939 | Moderado | Moderado | Moderado | Pouco evidente | Mod. diferenciado |
| 3465 | Moderado | Pouco | Moderado | Evidente | Mod. diferenciado |
| 444 | Moderado | Moderado | Moderado | Evidente | Mod. diferenciado |
| 928 | Moderado | Pouco | Moderado | Evidente | Mod. diferenciado |
| 107 | Pouco | Pouco | Ausente | Não evidente | Pouco diferenciado |
| 861 | Alto | Numerosas | Numerosas | Evidente | Pouco diferenciado |
| 318 | Alto | Moderado | Pouco | Pouco evidente | Pouco diferenciado |

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: ¹ Objetiva de 40x, ² Objetiva de 10x. Pouco (0-2), Moderado (3-5) e Numerosas (> 5).

de mitoses reduzido e (3) presença de pérolas de queratina (Figura 1) com pontes intercelulares evidentes.

Dentre as amostras classificadas como bem diferenciadas, a principal divergência foi quanto ao número de pérolas de queratina, que deveriam ser numerosas, mas que em dois casos estavam como poucas ou moderadas. Em relação ao estágio de invasão neoplásica, em quatro amostras o tumor invadiu a derme profunda e em uma amostra a invasão foi em derme reticular. Nenhuma das neoplasias apresentou metaplasia.

Os cinco tumores moderadamente diferenciados foram classificados desse modo por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear moderado, (2) números de mitose variando de pouco a moderado, (3) presença moderada de pérolas de queratina e (4) pontes intercelulares aparentes. Uma das amostras apresentou estágio de invasão no nível da derme reticular e outra apresentou estágio de invasão tão profundo que chegou a invadir a camada óssea. Nenhuma das amostras evidenciou a presença de metaplasia. Esse grupo foi o único que não apresentou divergências dentro dos parâmetros principais.

Dos três tumores considerados pouco diferenciados, duas amostras foram classificadas por apresentarem: (1) pleomorfismo celular e nuclear pronunciado e (2) número de mitoses variando de moderado a alto, com presença de mitoses atípicas. Além disso, pontes intercelulares evidentes e presença de pérolas de queratina variando de pouco a numerosas também foram observadas. O outro tumor classificado como pouco diferenciado foi classificado dessa maneira por não apresentar pérolas de queratina e pontes intercelulares, apesar de divergir quanto ao pleomorfismo nuclear e celular e número de mitoses.

Em relação aos demais parâmetros morfológicos analisados, estes foram considerados secundários e somente serviram de auxílio para a interpretação da classificação (Quadro 2).

Com relação à imuno-histoquímica, somente sete amostras foram analisadas em razão da quantidade de material existente nos blocos de parafina. Dentre as sete amostras, nenhuma apresentou expressão positiva para os anticorpos anti-p53 e anti-e-caderina; porém, para o marcador anti-e-caderina, algumas amostras apresentaram marcação fraca na pele normal, mas nenhuma na epiderme neoplásica.

Já as metaloproteinases imunomarcadas foram evidenciadas, ao microscópio de luz, como uma

pigmentação acastanhada. A positividade foi observada principalmente nas células tumorais, a marcação foi predominantemente citoplasmática e ocasionalmente nuclear. Das sete amostras analisadas, em quatro (57,1%) foi detectada a expressão da MMP-2 variando de fraco (+) a forte (+++) e em três (42,9%) não foi detectada a expressão da MMP-2. Com relação à expressão da MMP-9, das sete amostras analisadas, quatro (57,1%) foram consideradas positivas (Figura 2), variando de fraco a forte, e três (42,9%) negativas.

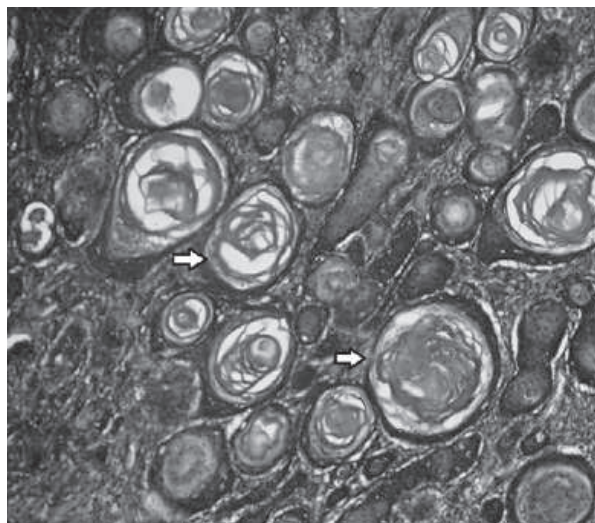


Figura 1 – CCE de pele de cão bem diferenciado. Presença de numerosas pérolas de queratina (setas). HE, Obj.20x

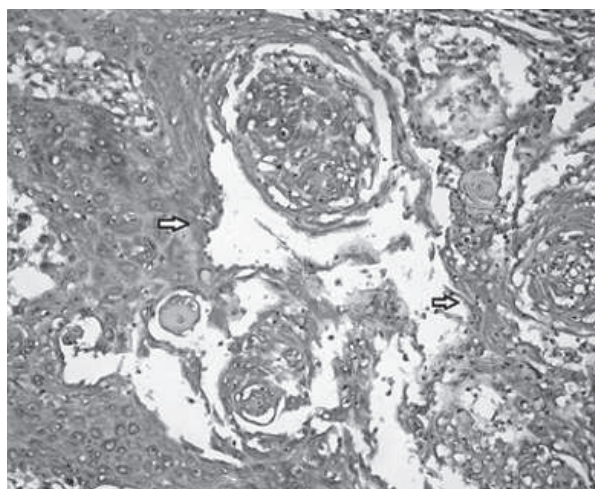


Figura 2 – CCE de pele de cão. Imuno-histoquímica para MMP-9. Marcação (+++) ou forte (coloração castanha escura) (seta branca e preta). Obj.20x

Quadro 2 – Parâmetros morfológicos secundários para a caracterização dos carcinomas de células escamosas (CCEs) de cães em 13 amostras selecionadas do Laboratório de Patologia Animal da PUCPR no período de 1996-2009

| Amostras | Estroma | Cordões/ Fileiras | População densa | Estágio de invasão | Metaplasia | Infiltrado inflamatório | Classificação |
|----------|---------|----------------------|--------------------|-----------------------|------------|----------------------------|--------------------|
| 461 | Sim | Não | Não | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Bem diferenciado |
| 2028 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Misto (Linf. + Neutrof.) | Bem diferenciado |
| 675 | Sim | Não | Não | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Bem diferenciado |
| 3113 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Bem diferenciado |
| 576 | Sim | Não | Sim | Derme reticular | Não | Misto (Linf. + Neutrof.) | Bem diferenciado |
| 3620 | Sim | Não | Sim | Derme reticular | Não | Linfoplasmocitário | Mod. diferenciado |
| 1939 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Mod. diferenciado |
| 3465 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Mod. diferenciado |
| 444 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Neutrofílico | Mod. diferenciado |
| 928 | Sim | Não | Sim | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Mod. diferenciado |
| 107 | Não | Não | Não | Derme reticular | Não | Ausente | Pouco diferenciado |
| 861 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Neutrofílico | Pouco diferenciado |
| 318 | Sim | Sim | Sim | Derme profunda | Não | Linfoplasmocitário | Pouco diferenciado |

Fonte: Dados da pesquisa.

Discussão

A pele e o tecido subcutâneo constituem os locais mais comuns de neoplasia em cães (cerca de 30%). Há uma grande variedade de tumores de pele descrita em cães (SCOTT et al., 2001; GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002), o que dificulta para os clínicos de pequenos animais o conhecimento de todas essas condições. Dentro dessa ampla variedade de tumores, destaca-se o carcinoma de células escamosas, que representa de 3% a 20% das neoplasias cutâneas e é considerado o segundo tumor de pele mais comum em cães (GOLDSCHMIDT; SHOFER, 1992; SCOTT et al., 2001). A variação da ocorrência do CCE é um reflexo da localização geográfica. Neste estudo, foi encontrada uma prevalência maior do CCE em cães, representando 43% das amostras analisadas, quando comparada a outras espécies. Esse neoplasma destaca-se por ocorrer com mais frequência em áreas cutâneas com exposição prolongada de radiação ultravioleta, fator que faz do Brasil um país favorável para o aparecimento desse tumor, já que predomina no país o clima tropical.

Conforme relatos de Goldschmidt e Schofer (1992) e Yager e Scott (1993), o carcinoma de células escamosas pode ocorrer em animais com menos

de 3 anos, variando de 5 a 15 anos, sendo a média de idade 10 anos, o que confirma os resultados encontrados neste estudo.

Quanto à raça dos animais afetados com CCE, a maior incidência ocorreu em cães sem raça definida (SRD), seguida pelos cães da raça boxer, compatível com o estudo realizado por Barros et al. (2008), segundo o qual cães de raças que não têm pelagem branca, como os da raça boxer, estão entre as raças predisponentes ao CCE. A alta taxa de incidência dos tumores em cães sem raça definida (SRD) pode ser explicada pelo fato de os atendimentos ocorrerem em hospital-escola, como é o caso da Unidade Hospitalar de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, origem da maioria dos materiais enviados ao Laboratório de Patologia Animal.

Observando-se o sexo dos animais, tanto as fêmeas quanto os machos foram acometidos, ainda que com maior porcentagem nas fêmeas, confirmando que quando se trata de neoplasias cutâneas como o CCE, não há distinção entre o sexo dos animais afetados, conforme descrito por Goldschmidt e Hendrick (2002) e Souza et al. (2006).

No que diz respeito à localização dos CCEs, a maior incidência foi na região abdominal, em

virtude do fato de que das seis amostras encontradas nesta região, cinco eram de cadelas e duas destas estavam localizadas na glândula mamária, local considerado por muitos autores como o mais comumente encontrado para a formação de tumores em cadelas (STRATMANN et al., 2008). O segundo local mais acometido foi a região da bolsa escrotal, seguido pelo membro pélvico. De acordo com Scott et al. (2001), tumores na região do prepúcio e pênis não são raros, principalmente naqueles animais que possuem essa região despigmentada e desprovida de pêlos, sendo que sua prevalência aumenta com o efeito da radiação solar. Com relação às duas amostras localizadas no membro pélvico, uma apresentou lesão na parte interna da coxa, próxima à região inguinal, condizendo com os resultados encontrados por Scott et al. (2001), Goldschmidt e Hendrick (2002) e Souza et al. (2006), segundo os quais os cães de pelagem clara, como o caso do boxer, podem apresentar a neoplasia nas regiões cutâneas abdominal e inguinal, dado o hábito de exposição solar em decúbito ventral e hipopigmentação da região abdominal.

Em um dos animais, o CCE foi encontrado no leito ungueal do 3º dígito. Wobeser et al. (2007) descreveram que o CCE representa mais de 30% das neoplasias encontradas nesse local, em cães. De acordo com Goldschmidt e Schofer (2005), o que se encontra histologicamente é uma extensa área de destruição do tecido ósseo, com invasão do tecido subungueal por cordões de células epiteliais escamosas neoplásicas. Essas células variam em grau de diferenciação, mas na maioria das vezes, formam grandes pérolas de queratina, confirmando, assim, os resultados encontrados neste estudo. Na classificação modificada, publicada pela Organização Mundial de Saúde (1998), o carcinoma de células escamosas subungueal é considerado um tipo neoplásico separado dos CCEs.

Os outros locais atingidos pelo CCE foram a pele da região cervical e a pálpebra, regiões altamente expostas à radiação ultravioleta. De acordo com Slatter (2005), o CCE pode ter origem palpebral, embora seja pouco descrito em cães, representando apenas 2,5% de 202 casos estudados.

Na medicina, existem atualmente cinco formas de classificação histológica para os carcinomas de células escamosas. Essas classificações surgiram na tentativa de explicar o comportamento

biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. Destaca-se o sistema de gradação histopatológica desenvolvido por Wahi (1971), publicado pela OMS e revisado por Barnes et al. (2005), que se baseia na classificação da neoplasia por meio de seu grau de malignidade, dividindo-se em três categorias: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (LOURENÇO et al., 2007).

Na medicina veterinária, o sistema de gradação que vem sendo utilizado para a classificação do CCE é aquele adotado pela OMS e desenvolvido por Weiss e Frese (1974), que também classifica o CCE como proposto por Wahi (1971). Há, ainda, o sistema de gradação de Broders, descrito por Goldschmidt e Schoffer (1992), segundo o qual o CCE é dividido em quatro graus histológicos: grau I ou bem diferenciado, quando apresenta numerosas pérolas de queratina e pontes intercelulares claramente evidentes com mínima atividade mitótica e pleomorfismo nuclear; grau II e III ou moderadamente diferenciados, quando apresentam pérolas de queratina ocasionais, pobres definições de pontes intercelulares e moderada atividade mitótica e hiperchromatismo nuclear; e grau IV ou pouco diferenciado, quando mostra pouca diferenciação escamosa, mas com acentuada atividade mitótica, pleomorfismo nuclear e hiperchromatismo.

O parâmetro morfológico mais importante para a classificação do CCE em cães observado neste estudo foi o pleomorfismo nuclear e celular, que apresentou pouca divergência (7,7%) quando comparado aos parâmetros número de mitoses, pérolas de queratina e pontes intercelulares (23-46%). Na literatura, o enfoque principal é sempre a classificação histológica (PARADIS et al., 1989; BARROS et al., 2008), não havendo dados sobre análise dos parâmetros morfológicos, como o realizado neste estudo.

Encontramos dificuldade em estabelecer a classificação histológica proposta pela OMS, em razão de algumas divergências encontradas em nosso material. Apesar do número reduzido de amostras, as divergências podem indicar a necessidade de análises mais precisas desses parâmetros morfológicos para a classificação de CCE em cães, já que erro de diagnóstico pode prejudicar a conduta terapêutica do médico veterinário.

Das amostras analisadas, a de número 107, localizada na pálpebra de cão boxer, foi classificada

como pouco diferenciada, apesar de apresentar pouco pleomorfismo celular e nuclear e número reduzido de mitoses acima da camada basal, o que a classificaria como CCE bem diferenciada. Essa amostra, assim como a analisada por Montiani-Ferreira et al. (2008), em um carcinoma de células escamosas de córnea, não apresentou pérolas de queratina, apesar de apresentar células epiteliais poligonais com núcleos grandes com citoplasma eosinofílico abundante, características do CCE.

Com relação à análise imuno-histoquímica, a ausência de expressão da proteína p53 pode ter ocorrido em virtude do processamento das amostras utilizadas neste estudo, que podem ter sido fixadas por muito tempo no formaldeído, principal fixador utilizado na rotina histológica e imuno-histoquímica (RAMOS-VARA, 2005). De acordo com Hayat (2002), a fixação excessiva pode produzir resultados falso-negativos em função de um excesso de reações cruzadas. Outra hipótese, além do processamento, é o fato de que o anticorpo utilizado nesse experimento não era específico para cães. Conforme Ruiz et al. (2005), a maior dificuldade no uso da imuno-histoquímica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Nesse caso, a utilização de anticorpos não específicos pode ter ocasionado um resultado negativo nas amostras analisadas. No caso da e-caderina, a expressão pode ser visualizada tanto no epitélio neoplásico como no epitélio não neoplásico, porém com menos intensidade. Neste estudo, não foi observada a expressão da e-caderina no carcinoma das amostras analisadas; notou-se apenas uma expressão muito reduzida da e-caderina em epitélio não neoplásico. A ausência da expressão de e-caderina poderia ser explicada pelas mesmas razões citadas para a p53.

A expressão das MMPs -2 e -9 foram detectadas tanto na epiderme não neoplásica como na epiderme neoplásica. Na epiderme não neoplásica, a expressão das MMPs foi identificada nos queratinócitos das camadas basais, nas glândulas sebáceas e no tecido conjuntivo. Esses achados têm sido descritos por outros autores em epiderme não associada à neoplasia, fato que tem sido interpretado como expressão antigênica constitutiva (RIBEIRO et al., 2008).

As metaloproteinases -2 e -9 são capazes de clivar o colágeno tipo IV por enfraquecer a membrana basal epitelial e endotelial, da qual o colágeno tipo IV representa o principal componente

estrutural. Dessa forma, as gelatinases desempenham importante função nos processos de invasão tumoral e metástase (HONG et al., 2000). Um achado interessante neste estudo e relatado também por Paparella et al. (2002) foi a imunomarcagem das MMP-2 e -9 nas células fibroblásticas localizadas perto da infiltração de células neoplásicas. Zucker e Biswas (1992) demonstraram que as células cancerígenas induzem os fibroblastos a produzirem as metaloproteinases, por meio de fatores estimuladores de colagenase do tumor. De acordo com esses autores, as MMPs são sintetizadas e secretadas pelas células mesenquimais, e absorvidas pelas células neoplásicas.

A reação positiva de quatro amostras para as metaloproteinases -2 e -9 (não encontrada nas outras proteínas) pode ser justificada em função da homologia existente entre as espécies (COUGHLAN et al., 1998; SANG; DOUGLAS, 1996). Por exemplo: a MMP-2 possui 96-98% de homologia entre ratos, camundongos, coelhos, seres humanos e bovinos; e a MMP-9 possui de 75-85% de homologia entre as mesmas espécies citadas (LANA et al., 2000).

Um importante fator prognóstico para o comportamento das neoplasias é o grau histológico ou o grau de malignidade. O atual potencial metastático do CCE é desconhecido, mas acredita-se que o carcinoma pouco diferenciado possua prognóstico mais desfavorável que as demais classificações. Assim sendo, ao se tentar relacionar o grau de malignidade com a expressão das metaloproteinases, observou-se neste estudo que, das quatro amostras consideradas positivas para ambas as MMPs, todas foram classificadas como bem diferenciadas e as três amostras negativas para ambas as MMPs foram classificadas como moderadamente diferenciadas. Encontrou-se relação entre as classificações e a expressão, o que poderia sinalizar que CCEs bem diferenciados apresentam poder de invasão maior que os moderadamente diferenciados. Se não retirados no início do desenvolvimento tumoral, poderiam tornar-se CCE pouco diferenciado, acarretando prognóstico mais desfavorável ao paciente.

Vale ressaltar, porém, que este estudo não permite concluir a existência de correlação significativa entre a expressão das MMPs e o grau de malignidade do CCE, em virtude do reduzido número de amostras.

Conclusões

O parâmetro morfológico considerado mais importante neste estudo foi o pleomorfismo nuclear e celular, divergindo com relação à classificação padrão somente em uma das 13 amostras analisadas. O número de mitoses, a presença de pérolas de queratina e as pontes intercelulares apresentaram divergências em número maior de amostras que o pleomorfismo nuclear e celular.

O uso de anticorpos não específicos para cães e a falta de dados sobre o tempo de fixação das amostras poderiam explicar a ausência de expressão da p53 e e-caderina em carcinoma de células escamosas de caninos encontradas neste estudo. Quanto às metaloproteinases -2 e -9, os achados imuno-histoquímicos neste estudo sugerem que as MMPs sintetizadas pelas células neoplásicas têm um papel importante no comportamento agressivo do carcinoma de células escamosas de cães e que o emprego desses marcadores na rotina da histopatologia veterinária poderia ser um indicador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas em cães.

Referências

- ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodological study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Oral Science**, v. 92, n. 5, p. 448-468, 1984.
- BARNES, L. et al. **World health organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005.
- BARROS, R. M. et al. Carcinoma da células escamosas multicêntrico em um cão. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 1, p. 103-108, 2008.
- BIRCHMEIER, W.; BEHRENS, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junction and the prevention of invasiveness. **Biochimica et Biophysica Acta, CR Reviews on Cancer**, v. 1198, n. 1, p. 11-26, 1994.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375-378, 1989.
- CARVALHO, T. et al. Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 66-73, 2005.
- CHAMBERS, A. F.; MATRISIAN, L. M. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 17, p. 1260-1270, 1997.
- COUGHLAN, A. R. et al. Isolation and identification of canine matrix metalloproteinases-2 (MMP-2). **Veterinary Journal**, v. 155, n. 3, p. 231-237, 1998.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. **Skin tumors of the dog and cat**. Oxford: Pergamon, 1992.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the skin and soft tissues. In: MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4th ed. Ames: Iowa State Press, 2002. p. 45-118.
- GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFER, F. S. **Subungual squamous cell carcinoma**. 2005. Available at: <<http://www.oncolink.org/types/article.cfm?c=22;s=69;ss=807&id=9527>>. Access on: 17 Apr. 2010.
- HARGIS, M. A.; GINN, P. E. The integument. In: HARGIS, M. A.; GINN, P. E. (Ed.). **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p. 1107-1261.
- HAYAT, M. A. Fixation and embedding. In: HAYAT M. A. (Ed.). **Microscopy, immunohistochemistry, and antigen retrieval methods for light and electron microscopy**. New York: Kluwer Academic, 2002. p. 71-93.
- HONG, S. D. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncology**, v. 36, p. 207-213, 2000.
- IGGO, R. et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. **Lancet**, v. 335, p. 675-679, 1990.
- JIANG, W. G. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. **British Journal of Surgery**, v. 83, n. 4, p. 437-446, 1996.
- JOÃO, C. F. **Expressão da e-caderina e do fator de crescimento do endotélio vascular no carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Ambientais Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

- LANA, S. E. et al. Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 111-114, 2000.
- LEIBMAN, N. F. et al. Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 6, p. 583-586, 2000.
- LOURENÇO, S. Q. C. et al. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.
- LYAKHOVITSKY, A. et al. Expression of E-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. **American Journal of Dermatopathology**, v. 26, n. 5, p. 372-378, 2004.
- MANDARA, M. T. et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in canine and feline meningioma. **Veterinary Pathology**, v. 46, n. 5, p. 836-845, 2009.
- MAYR, B. et al. Cytogenetic alteration in eight mammary tumors and tumor-suppressor gene p53 in one mammary tumor from dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 69-78, 1998.
- MAYR, B. et al. Novel canine tumor suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. **Veterinary Research Communication**, v. 23, n. 5, p. 285-291, 1999.
- MENDOZA, S. et al. Status of p53 and MDM2 genes in canine osteosarcoma. **Anticancer Research**, v. 18, n. 6A, p. 4449-4453, 1998.
- MONTIANI-FERREIRA, F. et al. Corneal squamous cell carcinoma in a dog: a case report. **Veterinary Ophthalmology**, v. 11, n. 4, p. 269-272, 2008.
- MORALES, D. S. R. et al. Matriz metaloproteinase 2: um importante marcador genético para coleostomas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 1, p. 55-61, 2007.
- MURAKAMI, Y. et al. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1, p53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas, basal cell tumors of dogs and cats. **Journal of Veterinary Science**, v. 62, n. 7, p. 743-750, 2000.
- OWSTON, M. A.; RAMOS-VARA, J. A. Histologic and immunohistochemical characterization of a testicular mixed germ cell sex cord-stromal tumor and a Leydig cell tumor in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p. 936-943, 2007.
- PAPPARELLA, S. et al. Expression of metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 4, p. 271-276, 2002.
- PARADIS, M. et al. Squamous cell carcinoma of the nail bed in three related giant schnauzers. **Veterinary Record**, v. 125, n. 12, p. 322-324, 1989.
- POWERS, B. E. The pathology of neoplasia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Ed.). **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. p. 54-67.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 405-426, 2005.
- RIBEIRO, R. I. M. A. et al. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 115-112, 2008.
- RUIZ, F. S. et al. Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n. 4, p. 263-270, 2005.
- SANG, Q. A.; DOUGLAS, D. A. Computational sequence analysis of matrix metalloproteinases. **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 137-160, 1996.
- SCOTT, D. W. et al. **Muller & Kirk's small animal dermatology**. 6th ed. Philadelphia: Saunders Company, 2001.
- SLATTER, D. Pálpebras. In: SLATTER, D. (Ed.). **Fundamentos de oftalmologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 159-220.
- SOUZA, T. M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006.
- STRATMANN, N. et al. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery**, v. 37, n. 1, p. 82-86, 2008.

- TEIKFE, J.; LOHR, C. Immunohistochemical detection of p53 over expression in paraffin wax- embedded squamous cell carcinoma of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 114, n. 2, p. 205-210, 1996.
- VELDHOEN, N. et al. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. **Oncogene**, v. 16, n. 2, p. 249-255, 1998.
- WAHI, P. M. **Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1971.
- WEISS, E.; FRESE, K. International histological classification of tumors of domestic animals: Tumors of the Skin. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 50, n. 1/2, p. 79-100, 1974.
- WESTERMARCK, J.; KAHARI, V. M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB Journal**, v. 13, n. 8, p. 781-791, 1999.
- WOBESER, B. K. et al. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 355-361, 2007.
- YAGER, J. A.; SCOTT, D. W. The skin and appendages. In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Ed.). **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic, 1993. p. 531-705.
- ZUCCARI, D. A. P. C. et al. Immunohistochemical evaluation of e-cadherin, Ki-67 and PCNA in canine mammary neoplasias: correlation of prognostic factors and clinical outcome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 207-215, 2008.
- ZUCKER, S.; BISWAS C. Tumor collagenase stimulating factor: a paracrine stimulator of fibroblast production of matrix metalloproteinase in cancer. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 92, p. 284-290, 1992.

Recebido: 06/03/2012

Received: 03/06/2012

Aprovado: 09/03/2012

Approved: 03/09/2012