

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**IMUNOMARCAÇÃO DOS RECEPTORES DE EGF (EGFR E c-ErbB2)
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES**

Paula Lima Magalhães

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria B. D. de Moura

GOIÂNIA
2017



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Paula Lima Magalhães

Título do trabalho: Imunomarcção dos receptores de EGF (EGFR e C-ErbB2) no Carcinoma de Células Escamosas em cães

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Paula L. Magalhães

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

[Assinatura]

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 29 / 08 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

PAULA LIMA MAGALHÃES

**IMUNOMARCAÇÃO DOS RECEPTORES DE EGF (EGFR E c-ErbB2)
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração:

Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica

Linha de pesquisa:

Patobiologia e morfofisiologia animal, experimental e comparada

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Veridiana M. B. D. Moura - EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Iglesias Santin - EVZ/UFG

Prof. Dr. Eugênio G. de Araújo - EVZ/UFG

GOIÂNIA
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Magalhães, Paula Lima

Imunomarcção dos receptores de EGF (EGFR e c-ErbB2) no Carcinoma de Células Escamosas em cães [manuscrito] / Paula Lima Magalhães. - 2017.
xii, 52 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura; co-orientadora Dra. Ana Paula Iglesias Santin; co-orientador Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Carcinoma espinocelular. 2. HER 1. 3. HER 2. 4. Fator de crescimento epidérmico. 5. cães. I. Moura, Veridiana Maria Brianezi Dignani de, orient. II. Título.

CDU 639.09

1 ATA NÚMERO **478** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **31/07/2017**, reuniu-se na sala
4 de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra
5 nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo
6 (a) Pós-Graduando (a) **Paula Lima Magalhães**, intitulada: “**Imunomarcção dos receptores de**
7 **EGF (EGFR e c-ErbB2) no carcinoma de células escamosas em cães**”, apresentado para obtenção
8 do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e**
9 **Cirurgia Animal**, desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Profa. Dra.**
10 **Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a)
11 candidato (a) **Paula Lima Magalhães** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A
12 seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os
13 quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-
14 se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se
15 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento,
16 considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

17 Profa. Dra. Veridiana Maria B. D. de Moura (Orientador (a))

Aprovada

18 Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes

Aprovada

19 Profa. Dra. Moema Pacheco Chediak Matos

Aprovada

20 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Paula Lima**
21 **Magalhães**, habilitada [(**Habilitado(a) ou não Habilitado(a)**)] pelo(s)
22 motivo(s) abaixo exposto(s):

23 _____

24 _____

25 _____

26 _____

27 _____

28 _____

29 _____

30 _____

31 _____

32 _____

33 _____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



34 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

35 Não se aplica

36

37

38

39

40

41 Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura** lavrei a
42 presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

43 Profa. Dra. Veridiana Maria B. D. de Moura

44 Profa. Dra. Louisiane de Carvalho Nunes

45 Profa. Dra. Moema Pacheco Chediak Matos

Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura
Louisiane de Carvalho Nunes
Moema Pacheco Chediak Matos

AGRADECIMENTOS

Sinto-me agraciada a Deus em todos os momentos da minha vida. Dessa vez, em especial, pelo fechamento de mais um ciclo acadêmico. Diferente da residência, que me ensinou, com excelência, a colocar em prática os conhecimentos adquiridos durante a graduação, o mestrado mostrou-me de perto o quanto o universo das pesquisas científicas é a chave para a manutenção da vida. Durante essa caminhada tive a contribuição de uma grande rede de apoio, incluindo familiares, tutores e amigos.

Gostaria de agradecer aos meus pais, Beralice e Paulo César e à minha irmã Renata, por serem a melhor torcida organizada e me apoiarem em todas as minhas decisões. Sem eles, nada disso seria possível. Aos meus “piliricos”, por trazerem alegria até nos meus piores dias.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura, agradeço imensamente pela enorme paciência, puxões de orelha e, principalmente, pelo amparo no momento em que fraquejei. Sem o seu suporte eu não teria seguido em frente. Gostaria de expor minha admiração por seu caráter e profissionalismo. Apesar de exigente, é uma pessoa de coração enorme, sempre pronta para ajudar. Espelho-me em seus ensinamentos.

Incluo os meus sinceros agradecimentos a todos do Setor de Patologia Animal da UFG, por me acolherem como membro de uma família desde o primeiro dia de residência. Lá se vão quatro anos de convivência e eu não poderia ter escolhido lugar melhor para trabalhar e aprender. Em especial ao prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito, pela solidariedade e boas risadas nos momentos de descontração. Ao Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo, por se disponibilizar na coorientação desse trabalho. Às professoras, Prof.^a Dr.^a Ana Paula Iglesias Santin, que também colaborou na coorientação do mestrado, Prof.^a Dr.^a Regiani Gango Pôrto e Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos, por serem tão amorosas e carinhosas comigo.

Gostaria de agradecer às minhas queridas amigas, Dr.^a Mariana Batista Rodrigues Faleiro e Dr.^a Lorena Cardoso Cintra, por me ajudarem na prática do experimento, agregando conhecimento técnico e vivência acerca das pesquisas científicas. Aos amigos Eric, Estela, Rafael, Bruna, Kátia, Jennifer, Ana Paula, Mauro e demais estagiários do Setor, muito obrigada pelas risadas e boa companhia. Agradeço também aos grandes amigos que Goiânia me trouxe Ana Carolina (Kaika), Luiza, Paulo José, Evelyn, Neryssa, Rodolfo, residentes e

estagiários do Setor de Grandes Animais que estão presentes no meu dia a dia e me ajudaram cada um à sua maneira. Jamais esquecerei tamanho carinho.

Agradeço ao meu amor, Felipe Ribeiro, por ter entrado na minha vida para somar em todas as conquistas que vieram e que ainda estão por vir. Obrigada por acreditar no meu potencial, ter tido paciência e compreensão nos momentos difíceis e me mostrar sempre o lado positivo das coisas. Te amo muito.

À banca examinadora, Prof.^a Dr.^a Louisiane de Carvalho Nunes e Prof.^a Dr.^a Moema Pacheco Chediak Matos, por aceitarem o convite e por contribuírem na minha formação.

Por fim, porém não menos importante, gostaria de agradecer a Deus por ter me direcionado a seguir nesse caminho e por ter se manifestado através do coração de cada um que esteve comigo. Amo vocês.

SUMÁRIO

Resumo	XV
Abstract.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 importância, epidemiologia e diagnóstico do cce.....	3
2.1. Proteínas quinases e proteínas fosfatases	7
2.2. Receptores tirosina quinase (rtq)	10
2.3. Receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (egfr).....	12
2.4 Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (c-erbb2 ou her2).....	14
2.5 Inibidores tirosina quinases e anticorpos monoclonais na terapia contra o câncer	15
3.OBJETIVOS.....	16
4. HIPÓTESE	16
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
6. RESULTADOS	21
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 -A) Fotomicrografia do CCE à citologia. Acentuado infiltrado neutrofilico e células epiteliais neoplásicas dispostas isoladamente ou em pequenos grupos (Objetiva 10x). B) Células epiteliais apresentando anisocitose, anisocariose e basofilia citoplasmática (Objetiva 20x). C) Células epiteliais com grânulos e halo eosinofílico (seta e cabeça de seta), sugerindo queratinização (Objetiva 100x). D) Células epiteliais com vacuolização e basofilia citoplasmática, anisocitose e anisocariose. Nota-se o amoldamento e edentação nuclear (seta e cabeça de seta) (Objetiva 100x). Coloração de GIEMSA. 5
- FIGURA 2- Fotomicrografia de CCE cutâneo bem diferenciado em cão. A) Pérolas de queratina em abundância (setas pretas). Coloração HE, objetiva 10x. B) Destaque de uma pérola de queratina (seta preta). HE, objetiva 40x. C e D) CCE cutâneo pouco diferenciado em cão. Anaplasia, pleomorfismo e produção de queratina notavelmente reduzida. Objetivas 20x e 40x, respectivamente. Coloração de Hematoxilina e Eosina. 6
- FIGURA 3- Fotomicrografia de CCE canino. A) Marcação imunoistoquímica para E-caderina demonstrando a expressão preservada na membrana plasmática de um CCE bem diferenciado. B) Expressão alterada de E-caderina no citoplasma de um CCE pouco diferenciado. 7
- FIGURA 4 Esquema do funcionamento das proteínas quinases e fosfatases. As proteínas quinases realizam reações de forforilação através da transferência de um grupo fosfato, com conseqüente gasto de energia em forma de ATP. De forma contrária, as proteínas fosfatases realizam a reação de desfosforilação hidrolisando o grupo fosfato. 8
- FIGURA 5- Esquema das proteínas quinases e proteínas fosfatases. As proteínas quinases podem ser divididas em tirosinas quinases receptoras, como EGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), e proteínas tirosina quinases não receptoras, tendo como exemplo a proteína Src. 9
- FIGURA 6- Desenho esquemático mostrando um receptor tirosina quinase e seu funcionamento. O receptor é composto por dois monômeros, divididos em três segmentos, um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembranar e um domínio tirosina quinase citoplasmático. 11

- FIGURA 7- Desenho esquemático da ativação da cascata de sinalização das vias (PI3K/PKB) e Ras/Raf/MEK/MAPK até a transdução de sinal de crescimento e diferenciação no núcleo. 11
- FIGURA 8- Desenho esquemático dos membros da família de receptores do fator de crescimento epidermal humano que inclui HER1, HER 2, HER 3 e HER 4. Importantes reguladores de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. Fonte: <http://cancergrace.org/cancer-treatments/files/2009/03/her-family>. 12
- FIGURA 9- Desenho esquemático do mecanismo de tráfego realizado por HER1. Após a ligação do FC com o HER1, o complexo HER1-FC pode ser transportado para dentro da célula por endocitose. O complexo internalizado pode ser posteriormente degradado por lisossomos (L) ou dissociado do FC e reciclado de volta à membrana. 13
- FIGURA 10- Fotomicrografia dos controles positivos para os anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2. A) Placenta humana com imunomarcção positiva para anti-EGFR. IHQ, objetiva 10x. B) Carcinoma mamário humano com imunomarcção positiva para anti-c-ErbB2. IHQ, objetiva 10x. 19
- FIGURA 11- Escores de intensidade de imunomarcção para os anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2. 20
- FIGURA 12- Gráfico demonstrando a relação entre o gênero e as raças de cães obtidos no levantamento epidemiológico, no período de 2006 a 2015. 21
- FIGURA 13- Carcinoma de células escamosas na pele de um cão. Lesões produtivas (cabeça de seta) e erosivas (setas) na pele da região abdominal, com sangramento fácil. 22
- FIGURA 14- Distribuição das localizações anatômicas de ocorrência do CCE nos cães provenientes do setor de Patologia Animal da EVZ/UFG, no período de 2006 a 2015. 22
- FIGURA 15- Fotomicrografia das graduações histológicas consideradas para o CCE canino. A) CCE bem diferenciado. Presença de cordões celulares (seta) e pérolas de queratina (cabeça de seta). HE. Objetiva 20X; B) CCE moderadamente diferenciado. Padrão desarranjado e ocasionais cordões neoplásicos. HE. Objetiva 10x. C) CCE pouco diferenciado. Ausência de arranjo em ilhas e cordões de células neoplásicas. HE. Objetiva de 40x. D) CCE bem diferenciado. Células neoplásicas com discreta anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. HE. Objetiva 100x. E) CCE moderadamente diferenciado. Moderada anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Presença de figura de mitose. HE. Objetiva 40x. F) CCE pouco diferenciado. Acentuada anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Presença de figuras de mitose atípicas. HE. 40x. 23

- FIGURA 16- Fotomicrografia de CCE canino. A) Epitélio displásico adjacente a área neoplásica demonstrando distribuição uniforme de imunomarcção anti-EGFR nas diferentes camadas celulares. IHQ, objetiva 4x. B) Imunorreatividade positiva (3+) para anti-EGFR. Marcação em membrana plasmática com concomitante positividade citoplasmática. IHQ, objetiva 10x. C) Positividade para anti-EGFR em glândulas sebáceas. IHQ, objetiva 10x. 24
- FIGURA 17- Distribuição dos casos de CCE avaliados considerando os escores de distribuição da imunomarcção imunoistoquímica para anti-EGFR. O escore 1 foi determinado em 27 (38,6%) casos, seguido pelos escores quatro 20 (28,6%), dois 16 (22,9%) e três 7(10%). 25
- FIGURA 18- Fotomicrografia de CCE canino com imunomarcção para anti c-erbB2. A) Imunorreatividade predominantemente citoplasmática em CCE moderadamente diferenciado. IHQ, objetiva 10x. B) Imunorreatividade positiva em CCE pobremente diferenciado. IHQ, objetiva 10x. C) Camadas basais e superficiais marcadas para anti-c-erbB2. IHQ, objetiva 4x. 25
- FIGURA 19- Distribuição dos casos de CCE avaliados considerando os escores de distribuição da imunomarcção imunoistoquímica para anti-c-erbB2. O escore 1 foi determinado em 24 (34,3%) casos, seguido pelos escores dois 19 (27,1%), quatro 18 (25,7%) e três 9 (12,9%). 26

LISTA DE ABREVIATURAS

- Bcl-2 - Proteína do gene *B-cell lymphoma/leukemia-2*
- CD1 - Ciclina D1
- Cdk - Ciclina dependente quinase
- CdkI - Inibidor de ciclina dependente quinase
- c-erbB-2 - Mesmo que Her-2: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 2*
- c-erbB-3 - Mesmo que Her-3: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 3*
- c-erbB-4 - Mesmo que Her-4: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 4*
- c-MYC - Proto oncogene *myelocytomatosis*
- c-myc – Proteína produto do Proto oncogene *myelocytomatosis*
- DAB – Diaminobenzidine
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DPC- Dímeros de pirimidina ciclobutano
- EGF - Fator de crescimento epidérmico
- EGFR - Receptor do fator de crescimento epidérmico
- ELISA - *Enzyme linked immuno sorbent assay*
- EPR – Epiregulin
- ErbB1-Gene do EGFR ou Her1: *Erythroblasticleucemia viral oncogene homologo 1*
- ErbB2-Gene do Her2ou c-erbB-2: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 2*
- ErbB3-Gene do Her3 ouc-erbB-3: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 3*
- ErbB4-Gene do Her4 ou c-erbB-4: *Erythroblastic leucemia viral oncogene homologo 4*
- FC - Fator de crescimento
- FGF - Fator de crescimento fibroblástico
- FGFR - Receptor do fator de crescimento fibroblástico
- HB-EFG - Heparina EGF
- HB-EGFR - fator de crescimento epitelial ligante de heparina
- HE - Hematoxilina e Eosina
- HER1 - Proteína codificada pelo gene ErB1
- HER2 - Proteína codificada pelo gene ErbB2
- HER3 - Proteína codificada pelo gene ErbB3
- HER4 - Proteína codificada pelo gene ErbB4
- IGF-I - Fator de crescimento semelhante a insulina
- INCA - Instituto nacional de câncer
- INK4 - Inibidor de CDK4
- Ki-67 - Proteína nuclear responsável pela proliferação celular
- KIP - *Kinase inhibitor protein* (inibidor de proteína quinase)
- MAPK - Proteína quinase ativadora de mitose
- Mdm2 - *protein murine double minutes 2*
- MEK - *Mitogenactivated protein kinase*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

p53 - Proteína de 53 kDa, p53

p63 - Proteína de 63 kDa, p63

PBS - *Phosphatebuffered saline*

PCR - *Polymerase chain reaction* - Reação de cadeia de polimerase

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF α – Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa

PI3K - fosfatidil inositol 3,4,5 quinase

PQC - Proteína quinase C

PTEN - *Phosphataseand tensin homolog deleted from chromosome 10*

RAS - proteínas G monoméricas

RNA - Ácido ribonucleico

RNA_m - Ácido ribonucléico mensageiro

TGF- α - Fator de crescimento transformador alfa

TP53 - Gene que codifica a proteína 53

UFG - Universidade Federal de Goiás

UV- Radiação ultravioleta

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um dos tumores cutâneos malignos mais comuns em todas as espécies animais, assim como na espécie humana, podendo acometer desde animais jovens a idosos. Tem desenvolvimento associado a fatores ambientais como exposição prolongada aos raios solares e hipopigmentação epidermal. Os estudos revelam que, 80% das neoplasias malignas têm origem em estímulos ambientais, em decorrência a exposição a carcinógenos. Apesar da etiologia multifatorial, a busca pelo esclarecimento das causas e dos mecanismos de evolução do câncer deve ser incessante, pois inúmeras neoplasias podem ser prevenidas, especialmente quando induzidas por fatores exógenos. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar o CCE cutâneo canino à luz dos diferentes padrões histomorfológicos da neoplasia, avaliando o seu imunofenótipo quanto aos receptores do fator de crescimento epidérmico EGFR e c-erbB2. Para tal, foram avaliadas os casos de CCE canino provenientes do arquivo do Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG no período de 2006 a 2015. Para o estudo epidemiológico foram consideradas as informações de registro, incluindo raça, sexo, idade e localização anatômica. Quanto à avaliação histomorfológica e critérios de malignidade, as lesões foram classificadas de acordo com o sistema preconizado por Müller e Kirk's. Para o estudo imunistoquímico foram utilizados os anticorpos anti-EGFR (HER1) e anti-c-erbB-2 (HER2), com o intuito de melhor compreender a participação dessas proteínas nos mecanismos envolvidos na gênese, proliferação e evolução do CCE em cães. Considerando as análises histomorfológica e imunofenotípica foi testada a correlação entre suas variáveis, sendo constatada correlação entre a imunomarcagem para EGFR e o grau de diferenciação do CCE ($r=0,26$; $p=0,02$). Por outro lado, não houve correlação entre a imunomarcagem de c-erbB2 e a diferenciação histomorfológica ($r=0,02$; $p=0,83$). Quando testada a correlação entre as imunomarcagens de EGFR e c-erbB2, também foi observada correlação positiva, porém sem significância estatística ($r=0,21$; $p=0,06$). Conclui-se que há propensão de que o aumento na imunexpressão de EGFR seja diretamente proporcional ao grau de diferenciação do CCE, sendo que o mesmo não ocorre com a imunomarcagem de c-erbB2. Também, os CCE em cães parecem apresentar aumento simultâneo da imunomarcagem dos receptores de EGF.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, HER1, HER2, fator de crescimento epidérmico, imunistoquímica, cães, oncologia.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common malignant cutaneous tumors in all species, as well as in the human species, ranging from young animals to the elderly. It has development associated with environmental factors such as prolonged exposure to solar rays and epidermal hypopigmentation. According to the literature, 80% of malignancies originate in environmental stimuli, due to exposure to carcinogens. Despite the multifactorial etiology, the search for clarification of the causes and mechanisms of cancer evolution must be incessant, since innumerable neoplasms can be prevented, especially when induced by exogenous factors. The aim of this study was to study canine cutaneous SCC in the light of different histomorphological patterns of the neoplasia, evaluating its immunophenotype response to EGFR and c-erbB2 epidermal growth factor receptors. For that, the cases of canine SCC were analyzed from the archive of the Animal Pathology Sector of the EVZ / UFG from 2006 to 2015. For the epidemiological study, registration information was considered, including breed, sex, age and anatomical location. Regarding the histomorphological evaluation and malignancy criteria, the lesions were classified according to the system recommended by the Müller e Kirk's. Anti-EGFR (HER1) and anti-c-erbB-2 (HER2) antibodies were used for the immunohistochemical study to better understand the role of these proteins in the mechanisms involved in the genesis, proliferation and evolution of SCC in dogs. Considering the histomorphological and immunophenotypic analyzes, the correlation between its variables was tested, and a correlation was verified between the EGFR immunostaining and the degree of SCC differentiation ($r = 0.26$, $p = 0.02$). On the other hand, there was no correlation between c-erbB2 immunostaining and histomorphological differentiation ($r = 0.02$; $p = 0.83$). When the correlation between EGFR and c-erbB2 immunoblots was tested, a positive correlation was also observed, but not statistically significant ($r = 0.21$, $p = 0.06$). It is concluded that there is a propensity that the increase in EGFR immunoexpression is directly proportional to the degree of SCC differentiation, and that it does not occur with c-erbB2 immunostaining. Also, SCCs in dogs seems to exhibit simultaneous increase of EGF receptor immunostaining.

Keywords: Squamous cell carcinoma, HER1, HER2, epidermal growth factor, immunohistochemistry, dogs, oncology.

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma das neoplasias epiteliais malignas de maior ocorrência em diferentes espécies, com principal incidência em países de regiões tropicais devido à exposição prolongada a radiação solar. O cão, uma espécie animal que apresenta a enfermidade com características semelhantes aos humanos, tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo dessa neoplasia em suas diferentes apresentações.

O CCE é diagnosticado a partir do exame histopatológico e classificado com base na sua histomorfologia em bem diferenciado, quando apresenta numerosas pérolas de queratina e pontes intercelulares claramente evidentes, com mínima atividade mitótica e pleomorfismo nuclear; moderadamente diferenciado, quando apresenta pérolas de queratina ocasionais, pobres definições de pontes intercelulares, moderada atividade mitótica e hipercromatismo nuclear; e pouco diferenciado, quando mostra pouca diferenciação escamosa, mas com acentuada atividade mitótica, pleomorfismo nuclear e hipercromatismo^{12,13,14}.

Aliado à histopatologia, os marcadores imunistoquímicos, além do propósito de diagnóstico, têm sido utilizados para avaliar o potencial de transformação maligna e a evolução do CCE²⁰. Estudos têm comparado a imunomarcação em lesões *in situ* e invasivas, bem como naquelas metastáticas, levando a acreditar que alterações na imunexpressão dos mesmos podem estar relacionadas ao aumento do potencial de agressividade^{8,21}.

Diante disso, a melhor compreensão da biologia do câncer permite progresso notável no manejo clínico da doença neoplásica. Isso é resultado do crescente conhecimento acerca das estruturas moleculares e vias de sinalização de receptores tirosina quinase, o que levou ao desenvolvimento de diversas terapias alvo^{22,23,24}.

Durante as últimas décadas tem sido feito considerável progresso na elucidação do mecanismo envolvido no controle do crescimento e regulação de células eucarióticas¹. Dentre alguns mecanismos, os receptores tirosina quinases (RTQ) têm gerado grande interesse na oncologia².

As proteínas da família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), um receptor tirosina-quinase, desempenham papel importante na determinação da linhagem celular, na morfogênese de vários órgãos e na sobrevivência das células no adulto. Essas proteínas compreendem os receptores EGFR (HER1), c-erbB2 (HER2), c-erbB3 (HER3) e c-erbB4 (HER4). Sabe-se que a expressão aumentada de algumas dessas proteínas contribui para a tumorigênese, induzindo células a proliferar e resistir à apoptose^{3,4,5}.

O EGFR possui estrutura que contém três sítios de ligação, sendo um extracelular, um domínio hidrofóbico transmembrânico e um intracelular com um domínio de tirosina quinase para a transdução de sinal. A ativação do HER1 pela ligação com o fator de crescimento epidermal (EGF) ou TGF- α promove a dimerização ou a heterodimerização com outro membro da família HER, ativando a tirosina quinase associada ao receptor e esse resulta em uma cascata de sinalização de efeitos diversos, incluindo migração de células, maturação, diferenciação, metástase, angiogênese e inibição da apoptose^{3,6}.

O EGFR pode ter expressão aumentada em uma variedade de tumores sólidos, incluindo câncer de mama, carcinoma de cabeça e pescoço, pulmão e próstata⁷, sendo associado a maior agressividade tumoral e pior prognóstico, além da refratariedade à quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia^{8,9}.

O c-erbB2 não possui ligante específico para sua ativação, atuando como co-receptor de outros membros da família, como o EGFR, c-erbB3 e c-erbB4. Por ser o heterodímero de escolha, o c-erbB2 possui maior atividade de tirosina quinase e tende a ser mais potente em gerar sinais intracelulares, conferindo maior potencial mitogênico quando comparado aos homodímeros(18)⁸. Portanto, níveis de c-erbB2 podem afetar significativamente a sinalização do EGFR no câncer em humanos⁸.

Os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR e c-erbB2) desempenham papel como biomarcadores terapêuticos e prognósticos em algumas neoplasias em humanos, a exemplo do carcinoma mamário, porém sua relevância na patogênese e prognóstico dessas neoplasias ainda é controverso⁸(19).

Em veterinária, a expressão de EGFR já foi verificada em tumores mamários¹⁵, cerebrais primários(21), carcinomas nasais¹⁷, carcinomas de pulmão¹⁸ e de próstata⁷. A imunomarcção aumentada de c-erbB2 foi relatada entre 8,3% e 40% das neoplasias mamárias caninas¹⁵, e em 61% dos tumores gástricos em cães¹⁹. Entretanto, há poucos relatos consistentes acerca da expressão desses receptores no CCE em cães. Ressalte-se que EGFR e c-erbB2 são biologicamente semelhantes nas espécies canina e humana, com 80% de homologia quanto aos genes que codificam essas proteínas⁷.

Assim, com o intuito de melhor compreender aspectos relacionados à classificação histológica e agressividade envolvidas nas lesões de CCE em cães, este estudo teve por objetivo estudar suas características epidemiológicas e histopatológicas, bem como o perfil imunoistoquímico para os receptores de membrana EGFR e c-erbB2, correlacionando com seu comportamento biológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância, epidemiologia e diagnóstico do CCE

O CCE é também denominado carcinoma de células espinhosas, carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermoide¹³. É uma neoplasia comum em diferentes espécies, podendo ocorrer em animais jovens, porém a incidência aumenta com a idade⁴⁸. Essa dermatopatia corresponde a 2% das neoplasias cutâneas em cães, 15% em gatos e 25% em humanos^{65,72,73}. Animais de raças de pelo curto e pele branca ou albina apresentam incidência mais elevada de CCE, pois costumeiramente passam longos períodos deitados ao sol. Em cães, as raças Dalmatas, Pit Bull, Bull Terrier e Boxer são as mais acometidas^{48,74}.

Geralmente, o CCE é localmente invasivo e se infiltra na derme e nos tecidos subcutâneos adjacentes⁷². Em gatos, possui uma apresentação mais agressiva, com gradual perda tecidual⁶⁸. No entanto, a progressão para metástases é mais lenta, mas há relatos sobre a ocorrência de disseminação em linfonodos regionais e pulmão⁷⁵.

Macroscopicamente, o CCE apresenta duas formas, produtiva e erosiva. Os tumores produtivos possuem aspecto nodular, apresentam tamanho variável, superfície ulcerada e sangram facilmente. Os erosivos são os mais comuns e caracterizados por úlceras cobertas por crostas, que se tornam profundas e formam crateras^{48,65,76}.

Diversos fatores são associados ao desenvolvimento do CCE. Apesar do dano causado pela luz UV ser um fator importante, antígenos de papilomavírus foram encontrados em casos de CCE, sugerindo também etiologia viral para essa neoplasia⁷⁷. Outros fatores de risco identificados em humanos são quadros de imunossupressão, outras dermatopatias, inflamações crônicas, úlceras e a exposição a carcinógenos químicos^{67,77,78}. Em animais, essas condições ainda não estão totalmente esclarecidas¹³.

Há situações em que a maior ocorrência do CCE está associada a condições médicas e o uso de fármacos. A compreensão dos efeitos biológicos dos fármacos sobre a epiderme produz novo conhecimento acerca do CCE induzido por medicamentos⁶⁰. Um exemplo em humanos é o de pacientes que recebem transplante de órgãos e terapia imunossupressora para prevenir a rejeição do aloenxerto, onde a terapia pode predispor os pacientes a múltiplos efeitos colaterais, incluindo infecções cutâneas e neoplasias⁷⁹.

O CCE é a neoplasia mais comum em pacientes transplantados e seu risco é aumentado em sessenta a cem vezes quando comparado a pacientes imunocompetentes. Dois fármacos utilizados na imunossupressão de receptores de órgãos são a azatioprina, inibidor da síntese de purina, e a ciclosporina, um inibidor da calcineurina, uma fosfatase que ativa

linfócitos T. A azatioprina mostrou aumentar a fotossensibilidade decorrente da radiação UVA, na qual a energia transmitida normalmente não é suficiente para causar danos diretos ao DNA, no entanto, pode causar danos indiretos através do estresse oxidativo. A ciclosporina e outros inibidores da calcineurina também apresentam ações sobre o sistema imunológico do hospedeiro. A inibição de calcineurina bloqueia a ação da proteína p53, aumentando o potencial tumorigênico. Um estudo verificou que o tratamento com ciclosporina promoveu o crescimento tumoral em camundongos imunossuprimidos^{60,80,81}.

O CCE apresenta três variantes quanto ao potencial de malignidade, o *in situ*, o invasivo e o metastático⁶⁰. Na avaliação histológica, a morfologia celular é dividida em CCE bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado⁴⁸. Alguns autores incluem o moderadamente diferenciado na categoria de bem diferenciados¹³. A maioria dos CCE que acomete cães e gatos é do subtipo histológico bem diferenciado⁸².

O diagnóstico precoce do CCE é essencial para a intervenção terapêutica adequada, que pode resultar no controle por um longo tempo ou na cura^{65,83}. Pode-se suspeitar do CCE baseado na aparência da lesão e localização, porém o diagnóstico definitivo requer o exame microscópico do tecido envolvido⁸⁴. O exame citológico é uma ferramenta simples, barata e eficiente para o estabelecimento do diagnóstico presuntivo (Figura 1), porém o diagnóstico definitivo baseia-se no exame histopatológico e/ou imunoistoquímico⁸⁴.

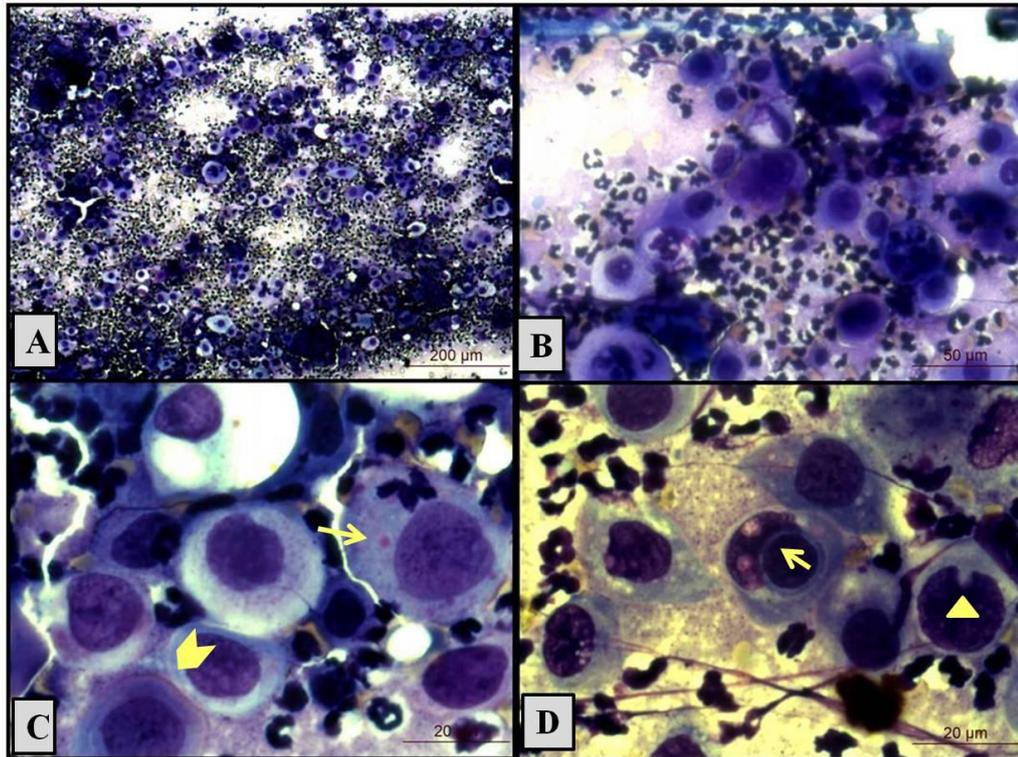


FIGURA 1- A) Fotomicrografia do CCE à citologia. Acentuado infiltrado neutrofílico e células epiteliais neoplásicas dispostas isoladamente ou em pequenos grupos (Objetiva 10x). B) Células epiteliais apresentando anisocitose, anisocariose e basofilia citoplasmática (Objetiva 20x). C) Células epiteliais com grânulos e halo eosinofílico (seta e cabeça de seta), sugerindo queratinização (Objetiva 100x). D) Células epiteliais com vacuolização e basofilia citoplasmática, anisocitose e anisocariose. Nota-se o amoldamento e edentação nuclear (seta e cabeça de seta) (Objetiva 100x). Coloração de GIEMSA.

Histologicamente, observa-se proliferação de queratinócitos neoplásicos formando ilhas, cordas e trabéculas que demonstram grau variado de diferenciação escamosa. Essas células estendem-se para a derme, associadas ou não à proliferação ou espessamento da epiderme excedente^{13,49}. Os queratinócitos apresentam citoplasma abundante, que varia de pálido a eosinofílico, com limites distintos, além de pontes intercelulares evidentes⁴⁹. O núcleo é grande, ovoide, com cromatina vesicular e nucléolo único e central proeminente. Anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular, assim como índice mitótico são variáveis, sendo os requisitos necessários para a classificação morfológica⁷⁶. A quantidade de queratina intracitoplasmática eosinofílica produzida pelas células neoplásicas é também bastante variável, sendo muito comum as pérolas córneas¹³ (Figura 2). Quando ocorre ulceração, esta é normalmente acompanhada de um infiltrado neutrofílico⁶⁸.

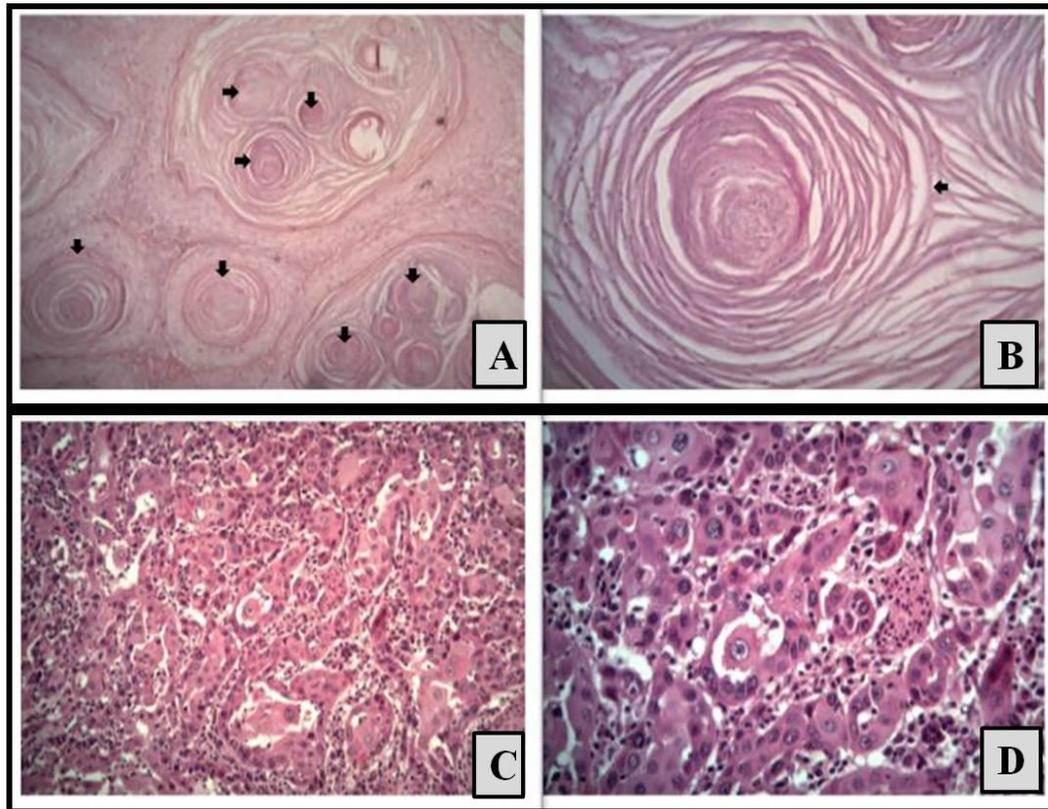


FIGURA 2- Fotomicrografia de CCE cutâneo bem diferenciado em cão. A) Pérolas de queratina em abundância (setas pretas). Coloração HE, objetiva 10x. B) Destaque de uma pérola de queratina (seta preta). HE, objetiva 40x. C e D) CCE cutâneo pouco diferenciado em cão. Anaplasia, pleomorfismo e produção de queratina notavelmente reduzida. Objetivas 20x e 40x, respectivamente. Coloração de Hematoxilina e Eosina. Fonte: Bedoya et al.⁴⁹.

O exame imunoistoquímico é útil na identificação do CCE pobremente diferenciado, que perde suas características originais, tornando difícil o seu reconhecimento microscópico⁷². Tal ferramenta também é capaz de avaliar indicadores de prognóstico, pela marcação de escores e distribuição de proteínas estruturais, como as caderinas e a p53⁸⁵. As citoqueratinas, proteínas que compõem os filamentos intermediários do citoesqueleto intracitoplasmático estão presentes somente nas células epiteliais^{49,85}. A identificação por IHQ da citoqueratina e do seu tipo em biopsias de tumores malignos pobremente diferenciados permite o diagnóstico da sua origem epitelial⁸⁵.

Um modelo de avaliação de prognóstico é a marcação imunoistoquímica para as caderinas, responsáveis pela adesão celular⁸⁶. O CCE apresenta significativa redução da expressão de caderinas quando comparado aos tumores de células basais. Observou-se que células neoplásicas bem diferenciadas apresentam imunocoloração mais intensa do que as indiferenciadas, que exibem imunocoloração difundida pela membrana plasmática e

citoplasma⁸⁶ (Figura 3). Essa expressão varia com o grau histológico. Em conclusão, sugere-se que a expressão reduzida ou alterada da E-caderina em tumores cutâneos pode indicar maior poder infiltrativo e conseqüente prognóstico desfavorável na espécie canina^{86,87}.

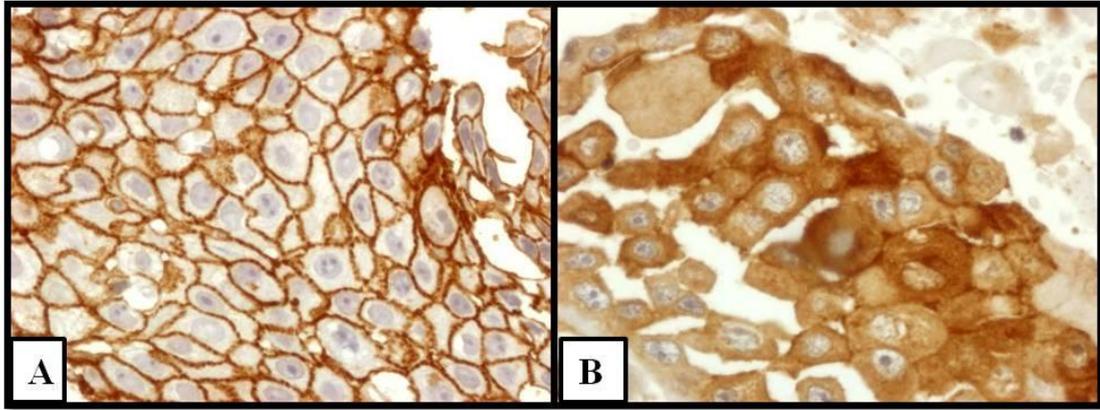


FIGURA 3- Fotomicrografia de CCE canino. A) Marcação imunoistoquímica para E-caderina demonstrando a expressão preservada na membrana plasmática de um CCE bem diferenciado. B) Expressão alterada de E-caderina no citoplasma de um CCE pouco diferenciado.

Fonte: Mestrinho et al⁸⁷.

Outro padrão relacionado ao grau tumoral é a marcação imunoistoquímica da p63, uma proteína homóloga da supressora tumoral p53, que é altamente expressa nas camadas basais ou progenitoras de muitos tecidos epiteliais, atuando em condições normais como um organizador epitelial, com função chave na senescência, morte celular e parada do ciclo celular, todos fatores determinantes no câncer^{88,87}.

2.1. Proteínas quinases e proteínas fosfatases

A morfologia de uma célula é determinada pelos tipos proteicos por essa expressos, incluindo sua concentração, forma e localização. Por sua vez, ao estudar o funcionamento normal e anormal dessas proteínas pode ser compreendida a sua fisiologia e a fisiopatologia de doenças²⁵.

Em células eucariontes há dois grandes grupos proteicos, as proteínas quinases e as proteínas fosfatases. Estas são as maiores famílias de proteínas e a chave central da comunicação e do controle intracelular, regulação e transdução de sinais^{1,26}. Esses dois grupos proteicos possuem atividade enzimática e catalisam reações de fosforilação e desfosforilação por meio da transferência ou hidrólise de um grupo fosfato a determinado substrato, com conseqüente gasto de energia (ATP)(Figura 4)²⁷.

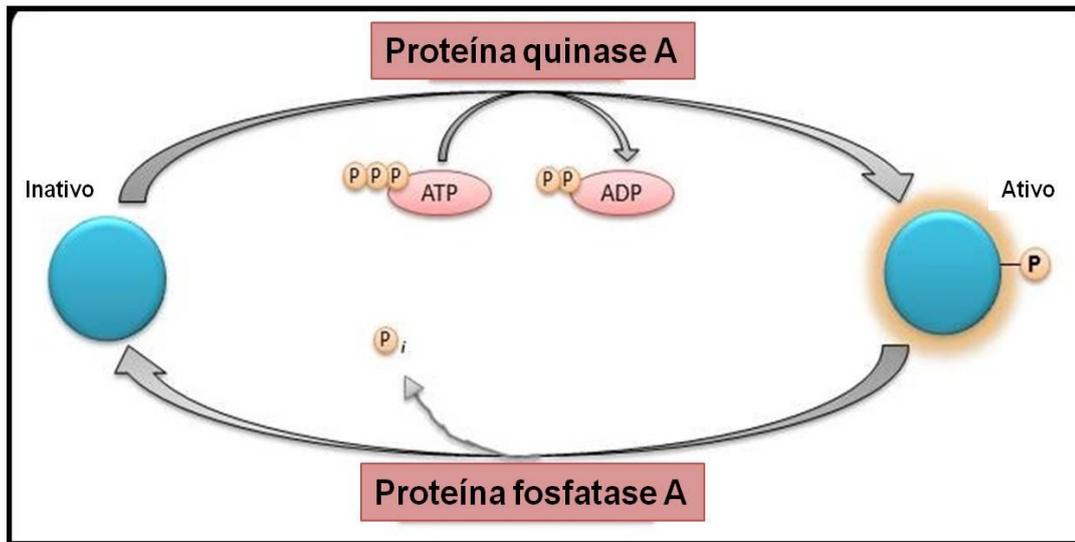


FIGURA 4- Esquema do funcionamento das proteínas quinases e fosfatases. As proteínas quinases realizam reações de fosforilação através da transferência de um grupo fosfato, com consequente gasto de energia em forma de ATP. De forma contrária, as proteínas fosfatases realizam a reação de desfosforilação hidrolisando o grupo fosfato.

Fonte: Adaptado de <http://namrataheda.blogspot.com.br/2013/02/signal-transduction-pathway-camp-pathway.html>

A reação é unidirecional e, dessa forma, o mecanismo regulador inclui vários eventos que vão desde o acoplamento da molécula, as alterações estruturais da proteína até o controle transcricional, sendo um mecanismo importante de sinalização celular e fundamental no processo de montagem e desmontagem de complexos proteicos^{26,28}.

Estima-se que o genoma humano apresente por volta de 2000 quinases e a desregulação dessas enzimas acarreta na fosforilação inapropriada de resíduos de tirosina e está associada ao desenvolvimento de neoplasias, diabetes e doenças resultantes de falhas no sistema imunológico^{1,26}. Dentre os mais diversos tipos de proteínas quinases e fosfatases, há as proteínas tirosina quinases (PTQ), onde a fosforilação ocorre em resíduos de tirosina, serina e treonina²⁹. Essas PTQ apresentam duas outras subdivisões: as tirosinas quinases não receptoras, que são citoplasmáticas e podem ser reguladas por diferentes mecanismos; e as tirosinas quinases receptoras (RTQ), proteínas transmembrânicas, ativadas por um ligante extracelular²⁶ (Figura 5).

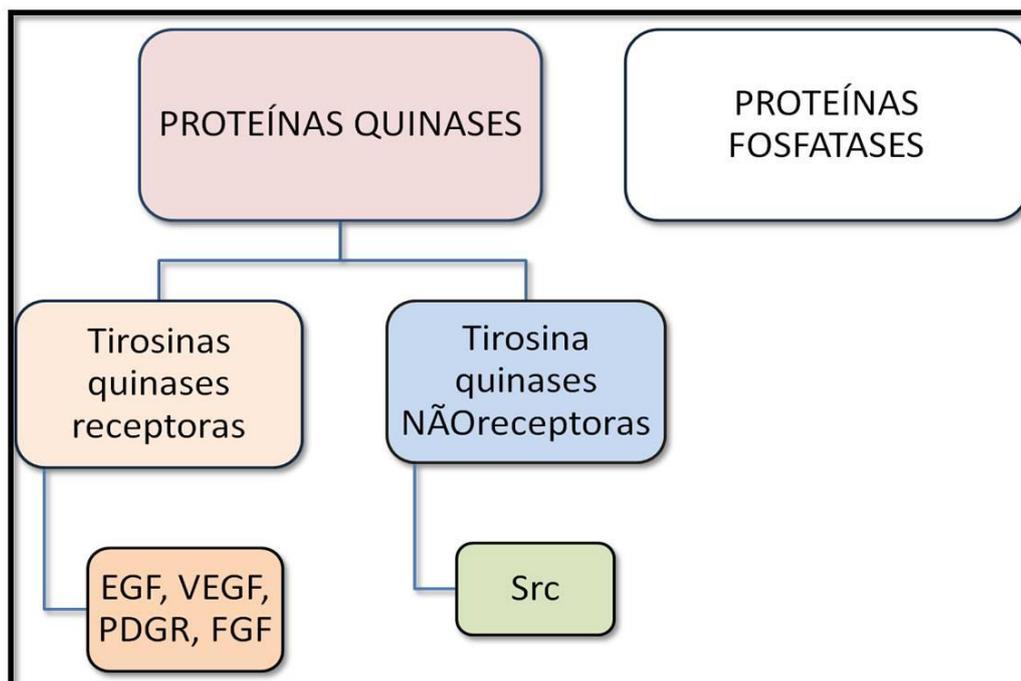


FIGURA 5- Esquema das proteínas quinases e proteínas fosfatases. As proteínas quinases podem ser divididas em tirosinas quinases receptoras, como EGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e fator de crescimento fibroblástico (FGF), e proteínas tirosina quinases não receptoras, tendo como exemplo a proteína Src.

A relação das proteínas quinases no desenvolvimento, manutenção e progressão do câncer pode ocorrer por falhas em diferentes níveis²⁶. O rearranjo genômico, que inclui a translocação cromossomal, gera a fusão de proteínas que contêm a parte do domínio catalítico e uma proteína não necessariamente relacionada que usualmente viabiliza a função de dimerização e consequente fosforilação, tal como ocorre na fusão dos genes *Bcr-Abl* na leucemia mieloide crônica em humanos²⁹.

As mutações e desregulações que conduzem à atividade quinase de oncogenes ou perda da função de supressores tumorais culminam na ativação errônea de fatores de transcrição³⁰. Isso ocorre, por exemplo, com o GTPase no oncogene *Ras*, onde sua ativação é verificada em 30-50% dos cânceres humanos²⁹. Além disso, a desregulação da atividade quinase pode ocorrer por superexpressão dos receptores da membrana plasmática, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)¹.

A fim de compreender os mecanismos de controle enzimáticos das proteínas quinases e seus subgrupos, muitas pesquisas têm sido realizadas acerca de novas descobertas no que diz respeito a vias de tratamento e novos fármacos²³.

2.2. Receptores tirosina quinase (RTQ)

A descoberta da ativação de receptores celulares e seus ligantes, responsáveis pelos mecanismos envolvidos na transdução de sinais por essa desencadeados em células tumorais, tornou possível a identificação, mensuração e posterior validação para a tentativa de novos alvos terapêuticos contra o câncer, levando ao desenvolvimento de novas classes de drogas, comumente conhecidas como terapias alvo^{2,23}.

As RTQ são componentes essenciais das vias de sinalização celular, operantes desde o desenvolvimento embrionário até a homeostase no indivíduo adulto². A família RTQ inclui, entre outros, o EGFR, os receptores do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR), os receptores do fator de crescimento dos fibroblastos (FGFR), os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR) e o receptor de insulina (IGFR)^{23,28}. Devido ao seu papel no crescimento, diferenciação, metabolismo e comunicação celular, muitos RTQ foram associados ao início ou progressão de vários tipos de câncer, seja através de mutações com ganho de função do receptor ou através da sua superexpressão^{2,31}.

A estrutura de um RTQ é composta por dois monômeros, divididos em três segmentos cada um, o domínio de ligação extracelular, domínio transmembranar e um domínio tirosina quinase citoplasmático²⁶. A primeira etapa da sinalização celular envolve a ligação do fator de crescimento com o segmento extracelular do RTQ. Os fatores de crescimento (FC) são um conjunto de moléculas, grande parte de origem proteica, que desempenham importante função na comunicação intercelular^{23,28}. Há diversos tipos de fatores de crescimento, que são denominados de acordo com o tipo de tecido em que seus receptores são expressos⁴.

O acoplamento do ligante com o seu receptor promove o processo de dimerização, união das duas estruturas monoméricas, e posteriormente a reação de fosforilação no domínio intracelular tirosina quinase, com gasto de energia na forma de ATP. No citoplasma, a fosforilação desencadeia uma cascata de reações que podem resultar em respostas celulares diferentes e, sequencialmente, promovem a transdução do sinal (Figura 6)^{2,26}.

Dois importantes vias de sinalização dos fatores de crescimento envolvidos na divisão celular, crescimento, metabolismo, sobrevivência são a via fosfatidilinositol 3-quinase/proteína quinase b (PI3K/PKB) e a via Ras/Raf/MEK/MAPK (Figura 7)²⁸. Estas interagem entre si fisiologicamente, porém quando um ou mais componentes estão mutados ou superexpressos são capazes de iniciar diversos cânceres descritos em humanos³¹.

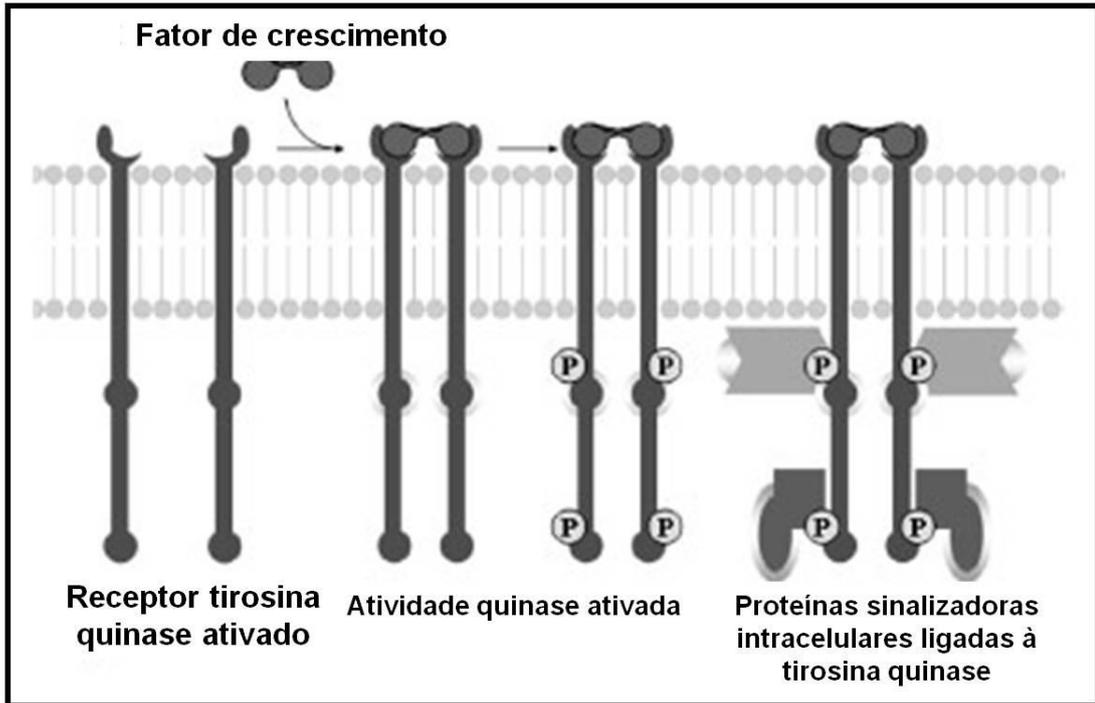


FIGURA 6- Desenho esquemático mostrando um receptor tirosina quinase e seu funcionamento. O receptor é composto por dois monômeros, divididos em três segmentos, um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembranar e um domínio tirosina quinase citoplasmático. Fonte: Adaptado de Silva et al.²⁶.

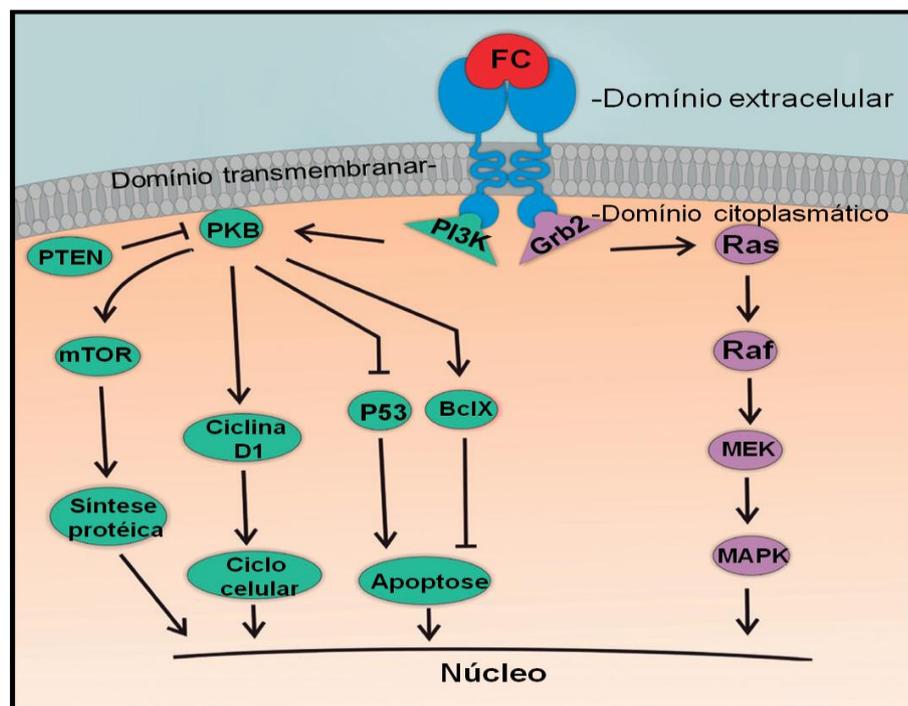


FIGURA 7- Desenho esquemático da ativação da cascata de sinalização das vias (PI3K/PKB) e Ras/Raf/MEK/MAPK até a transdução de sinal de crescimento e diferenciação no núcleo. Fonte: Adaptado de Leite et al.²³.

2.3. Receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR)

O EGFR (*epidermal growth factor receptor*), também conhecido como HER1 ou ErbB1, é uma glicoproteína da membrana plasmática, membro da família de receptores do fator de crescimento epidermal humano (HER - *humam epidermal growth factor receptor*), que inclui ainda o c-erbB2 (HER2), c-erbB3 (HER3) e c-erbB4 (HER4), todos importantes reguladores do crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares^{5,6}.

O EGFR é ativado por ligantes como o fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), fator ligante de heparina semelhante a EGF, ampiregulina e epiregulina^{17,22}. Após o acoplamento com o FC, o EGFR liga-se a outro receptor ativado, formando um homodímero, união de dois dímeros homólogos, ou um heterodímero, união dois dímeros heterólogos (Figura 8)²⁶.

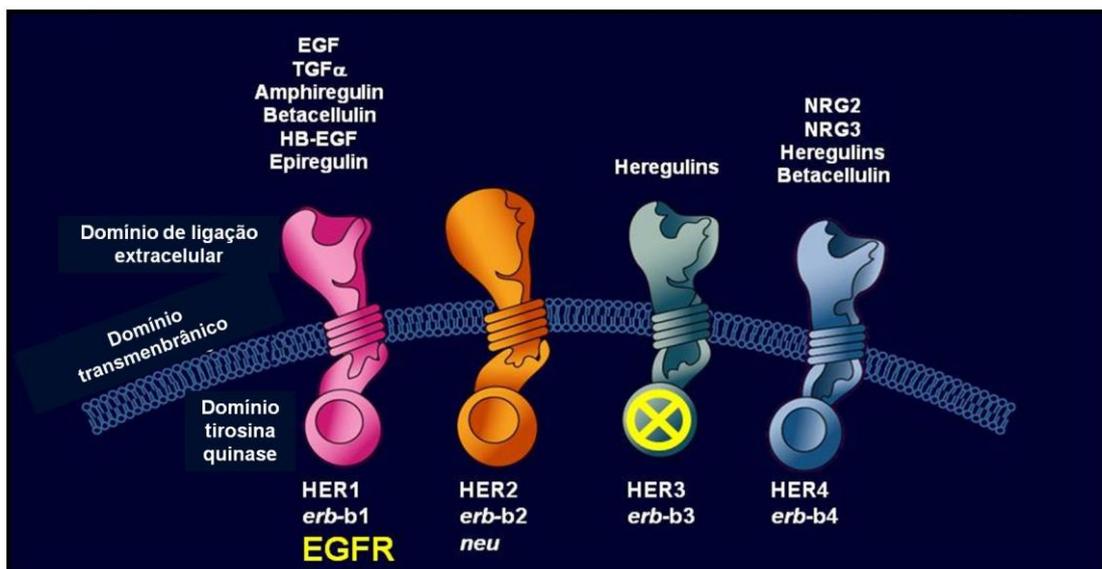


FIGURA 8- Desenho esquemático dos membros da família de receptores do fator de crescimento epidermal humano que inclui HER1, HER 2, HER 3 e HER 4. Importantes reguladores de crescimento, diferenciação e sobrevivência celular.

Fonte: <http://cancergrace.org/cancer-treatments/files/2009/03/her-family>.

O complexo HER1-FC apresenta um mecanismo de tráfego onde pode ser transportado para regiões específicas da membrana plasmática e então ser internalizado para dentro da célula pelo processo chamado endocitose. O complexo internalizado pode ser posteriormente degradado por lisossomos ou dissociado do FC e reciclado de volta à membrana (Figura 9)^{22,32}. Esse movimento do receptor é considerado crucial para a função do

EGFR, pois a sinalização do receptor continua durante esse processo e pode ser alterada por eventos do mecanismo de tráfego³².

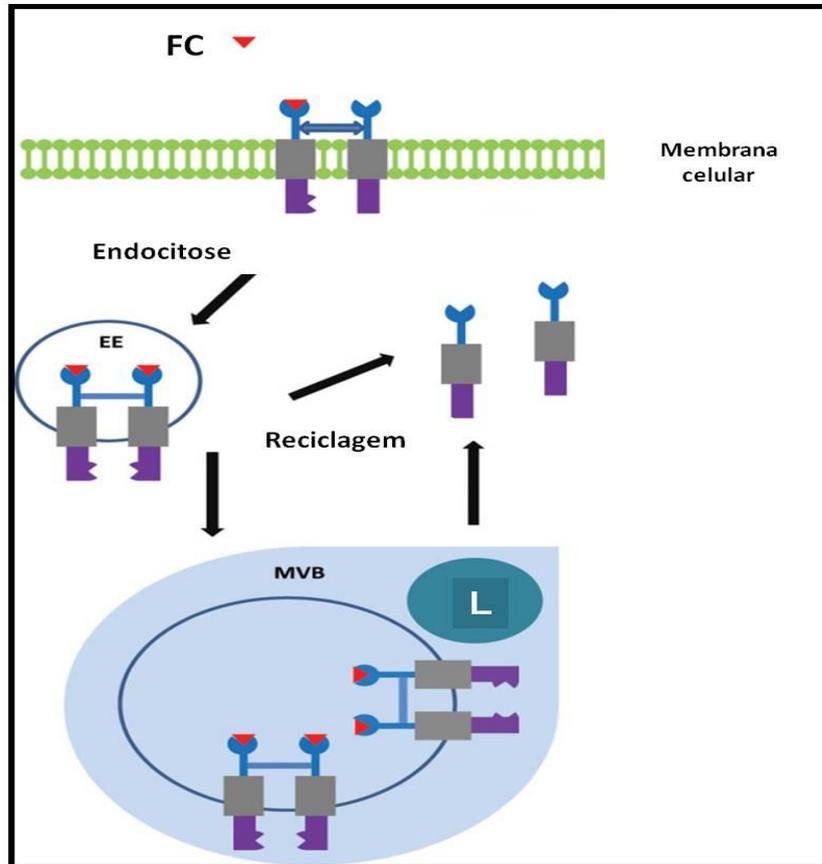


FIGURA 9- Desenho esquemático do mecanismo de tráfego realizado por HER1. Após a ligação do FC com o HER1, o complexo HER1-FC pode ser transportado para dentro da célula por endocitose. O complexo internalizado pode ser posteriormente degradado por lisossomos (L) ou dissociado do FC e reciclado de volta à membrana.

Fonte: Adaptado de Gaffney²².

No câncer, as alterações nos FC, seus receptores ou ainda nas vias de transdução de sinais por esses desencadeadas, podem estar presentes em várias características associadas à malignidade, entre as quais a independência na produção de FC, a insensibilidade aos genes supressores tumorais e consequente resistência à apoptose, indução à angiogênese, ativação da invasão e metastatização, potencial de replicação ilimitado, instabilidade genômica e mutação, além da desregulação energética celular^{19,23,28}.

Anormalidades no EGFR já foram verificadas em uma variedade de tumores sólidos, incluindo câncer de mama, carcinoma de cabeça e pescoço, pulmão e próstata^{7,8,18,33}. Estas incluem superexpressão, mutação, erros de sinalização e o tráfego de receptores

desregulados, sendo associados à agressividade tumoral, pior prognóstico e resistência à quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia e ausência ou diminuição na resposta à terapia com inibidores tirosina quinases anti-EGFR^{6,22,32}.

Em humanos, uma via reguladora autócrina envolvendo o EGFR tem sido associada à perda do controle do crescimento normal das células epidermais, que desencadeia o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCE-CP)³⁴. Nesse contexto, foram detectados níveis elevados na expressão de EGFR, sendo consistentemente correlacionados com diminuição da sobrevida, uma vez que o CCE-PC refere-se a sítios comuns que incluem cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, nasofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, laringe e glândulas salivares⁸.

Na medicina veterinária, a expressão de EGFR já foi demonstrada no CCE oral em felinos, em que 69% dos tumores testados reagiram positivamente²⁰. A positividade dessa proteína também foi observada em 66,7% dos CCE nasais caninos¹⁷ e 93% dos CCE oculares em equinos³⁵. Isso sugere alguma participação da via de sinalização de EGFR no desenvolvimento desses tumores. No entanto, até o momento, pouca investigação foi realizada em relação ao potencial de anormalidades *versus* grau de diferenciação tumoral, atividade proliferativa ou prognóstico nas diferentes espécies animais²³.

2.4 Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (c-erbB2 ou HER2)

Assim como o EGFR, o receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (c-erbB2) desempenha função fundamental na proliferação, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular através de múltiplas vias na transdução de sinais³⁶. O HER2, também conhecido como ErbB2, c-erbB2, ou HER2/neu, não possui um FC de ativação direta conhecido e pode estar em estado ativado constitutivamente ou se tornar ativo após a heterodimerização com outros membros da família HER, como HER1 e HER3^{36,37}. A heterodimerização resulta na fosforilação de resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do receptor e inicia várias vias de sinalização, principalmente a MAPK, PI3K e da proteína quinase C (PQC)³⁵.

Os sinais gerados por heterodímeros são mais potentes que os homodímeros e, aqueles que particularmente ligam-se ao c-erbB2, exibem alta potência de ligação e sinalização. A justificativa para isso seria porque o c-erbB2 apresenta conformação aberta, tornando-se preferência na escolha para dimerização entre os membros da família HER. Há também a suposição de que essa proteína seja capaz de dissociar-se rapidamente do complexo proteico, disponibilizando-se novamente para a superfície celular^{8,10,38}.

A proteína c-erbB2 é expressa em muitos tecidos de maneira fisiológica e desempenha função importante na patogênese de vários tipos de câncer, incluindo ovário, endométrio, bexiga, pulmão, cólon e cavidade oral^{19,37,39}. A amplificação ou mutação dessa oncoproteína tem sido comumente estudada em pacientes humanos com câncer mamário ou colorretal, em que aproximadamente 15-30% são positivos, servindo como biomarcador prognóstico e preditivo para essas neoplasias^{9,11,,39}.

Apesar de protocolos de teste c-erbB2 distintos também terem sido estabelecidos no carcinoma gástrico, não há uma padronização para o CCE, principalmente o CCE-CP^{6,19}. Conseqüentemente, patologistas aplicam as técnicas investigação de imunoistoquímica (IHQ) e hibridização *in situ* (FISH) de carcinomas mamários em CCE, um carcinoma biologicamente distinto³⁶. Nesse contexto, os relatos sobre a superexpressão do gene HER2 variam de 0-47% no CCE-CP em humanos^{37,40}. Em uma análise realizada em 213 tumores de CCE-CP foram identificados baixos níveis de expressão do gene HER2. Embora os níveis de RNAm de HER2 se correlacionem com a expressão proteica de c-erbB2, não foi observada correlação³⁶.

Um estudo realizado em equinos identificou pelo método de IHQ a imunomarcagem de c-erbB2 em 76% do CCE ocular, porém não foram realizados testes adicionais para averiguar a superexpressão gênica³⁵. Em caninos, as principais pesquisas relacionadas ao c-erbB2 são direcionadas aos tumores mamários em cadelas, tendo em vista a grande prevalência e homologia com os carcinomas mamários em mulheres^{8,9}. No entanto, a superexpressão de HER2 ainda não foi comprovada nos tumores mamários. Embora haja um número crescente de estudos de IHQ sobre esse tema, há grande variabilidade nos resultados⁸.

2.5 Inibidores tirosina quinases e anticorpos monoclonais na terapia contra o câncer

A escolha do tratamento do CCE depende de fatores como a localização do tumor, tamanho, extensão da invasão do tecido, índice mitótico, metástase, além da disponibilidade de equipamentos e restrições financeiras⁴¹. Geralmente, o tratamento de escolha é a excisão cirúrgica do tumor seguida por tratamento adjuvante como crioterapia, iridium-192, cisplatina intralesional ou 5-fluorouracil². Embora sejam utilizadas muitas modalidades de tratamento, poucas estão disponíveis na maioria das clínicas veterinária ou a campo para uso em grandes animais, e a maioria está associada a risco pessoal ao administrar o tratamento^{35,42}.

Em medicina há numerosas pesquisas pré-clínicas e clínicas para avaliar o papel do EGFR no desenvolvimento tumoral, dos quais HER1 e HER2 são estudados com mais

frequência⁴³. Em certos tipos de câncer que apresentam EGFR superexpressos e possuem valor prognóstico, os inibidores tirosina quinases (ITQ) e os anticorpos monoclonais (AM) são utilizados para adaptar o tratamento, pois alguns quimioterápicos inibem seletivamente alguns receptores e outros não^{44,45}.

A terapia-alvo está frequentemente dirigida aos FC, seus receptores ou ainda às moléculas envolvidas nas suas vias de sinalização intracelulares²². O mecanismo comum de ação dos ITQ é pela competição e inibição de maneira reversível da atividade tirosina quinase de promover a fosforilação, impedindo o estímulo à cascata de reações seguintes. Já os AM ligam-se especificamente ao domínio extracelular dos EGFR, competindo com a ligação do EGF em seu receptor^{23,33}.

O tratamento com essas substâncias é oneroso e ainda são necessárias pesquisas aprofundadas a fim de determinar a sua concentração ótima para citotoxicidade em células cancerosas sem maior comprometimento às células normais^{2,23}. Além disso, a elucidação da localização e do comportamento dos EGFR na célula constitui em melhor escolha de fármacos e tratamentos eficazes⁴. Mais de 20 ITQ e AM estão sob investigação pré-clínica e clínica em humanos^{4,23}. As justificativas para a concepção de estratégias de direcionamento do tratamento e prognóstico devem basear-se na avaliação dos níveis de expressão dos receptores em células tumorais através de IHQ, *Western blotting* e PCR^{20,46}.

3.OBJETIVOS

Com o intuito de melhor compreender aspectos relacionados à classificação histológica e agressividade envolvidas nas lesões de CCE em cães, este estudo teve por objetivo estudar suas características epidemiológicas e histopatológicas, bem como sua relação com o perfil imunistoquímico para os receptores de membrana EGFR (HER1) e c-erbB2 (HER2).

4. HIPÓTESE

Considerando a função do EGFR no controle da diferenciação celular e manutenção de um conjunto de células basais em proliferação no epitélio, espera-se observar correlação entre a expressão de EGFR e a diferenciação tumoral, assim como para a expressão de c-ErbB2.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Goiás (UFG), sob registro número 103/2015. O estudo retrospectivo foi realizado utilizando-se dados e amostras de 70 casos de CCE canino, diagnosticados ao exame histopatológico, no período de 2006 a 2015, no Setor de Patologia Animal (SPA), da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), da UFG, Goiânia, Goiás, Brasil.

A análise epidemiológica foi realizada com as informações obtidas das fichas de registro dos referidos casos, utilizando-se dados como raça, sexo, faixa etária e localização anatômica. As análises histopatológica e imunoistoquímica foram realizadas em amostras de CCE colhidas, fixadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo rotativo e submetidas à coloração de hematoxilina e eosina (HE) e à reação imunoistoquímica com os anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2.

A classificação histomorfológica do CCE foi realizada em cortes histológicos à espessura de 5 µm, corados por HE, utilizando critérios de Müller e Kirk's⁴⁸, sendo as amostras classificadas em CCE bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, com base na morfologia celular e no grau de queratinização da neoplasia.

As características histomorfológicas básicas observadas no CCE incluem alterações como a hiperplasia da epiderme associada a hiperqueratose e/ou paraqueratose, acantose e focos de elastose. As células neoplásicas possuem, a depender da diferenciação, padrão de organização em cordões ou ilhas. Individualmente, as células tumorais individuais apresentam citoplasma abundante, com coloração que varia de eosinofílica pálida a brilhante e bordos distintos. O núcleo das células é grande, único, ovoide e central, com nucléolo proeminente. As figuras mitóticas são variáveis, porém mais frequentes em tumores pouco diferenciados.

No diagnóstico histológico convencional do CCE, a neoplasia é caracterizada por lóbulos ou cordões de queratinócitos atípicos, originando-se da epiderme e invadindo a derme em forma de pequenas e largas ilhas. O CCE bem diferenciado é frequentemente caracterizado por pérolas córneas e queratinização de células individuais, com o mínimo de atipia celular. Na superfície tumoral pode ocorrer ulceração ou apresentar hiperqueratose. Em campo de grande aumento, observam-se pontes intercelulares entre os queratinócitos. O CCE moderadamente diferenciado apresenta pérolas de queratina ocasionais, pobres definições de pontes intercelulares, moderada atividade mitótica e hiperchromatismo nuclear. Já nos pouco

diferenciados há menor queratinização, atipia nuclear proeminente, numerosas figuras de mitose típicas e atípicas (Quadro 1).

QUADRO 1- Critério histomorfológicos considerados nos diferentes graus de diferenciação do CCE segundo Müller e Kirk's.

Classificação histológica	Critérios avaliados
Bem diferenciado	Cordões ou ilhas de células neoplásicas com citoplasma eosinofílico abundante, bordos distintos, pontes intercelulares evidentes e grande quantidade de pérolas córneas. Discreta anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Baixo índice mitótico.
Moderadamente diferenciado	Organização celular em eventuais cordões e ilhas associado a grupos celulares desarranjados. Pontes intercelulares bastante evidentes com queratinização de células únicas e raras pérolas córneas. Moderada anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Baixo índice mitótico com eventuais figuras de mitose atípicas.
Pouco diferenciado	Ausência do padrão de organização celular em cordões e ilhas. Células neoplásicas com citoplasma anfófilico, queratinização restrita a células isoladas, ausência de pontes intercelulares e pérolas de queratina. Marcante anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Alto índice mitótico com presença de figuras de mitose atípicas.

Para a avaliação imunoistoquímica foram utilizados cortes histológicos cortados à espessura de 4 µm, que foram distendidos sobre lâminas silanizadas (Starfrost® Green Slides with Cut Edges, 9536), secos à temperatura ambiente e, em seguida, mantidos à temperatura de 56°C durante 18 horas. Posteriormente, os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais de xilol, reidratados em banhos sequenciais de etanol e lavados em água destilada.

Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram incubados com reagente comercial específico, pronto para uso, durante 15 minutos (Dako Dual Endogenous Enzyme Block). A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão citrato (pH 6,0) em banho-Maria a 96°C, durante 40 minutos para o anticorpo anti-EGFR, e a mesma solução tampão em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina, Brasil), durante 25 minutos para o anticorpo anti-c-ErbB2. Seguiram-se o arrefecimento durante 20 minutos e a incubação com os anticorpos policlonais anti-EGFR (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA #E1817RUO), diluído a 1:50, e anti-c-ErbB2 (SpringBioscience, Pleasanton, CA, USA #E244RUO), à concentração de 1:100, em câmara úmida, a 4°C, por 18 horas.

Para a amplificação da reação, os cortes foram incubados em sistema de detecção de sinais com polímeros (Easy Link One, SP, BRAZIL #EP-12-20506), por 30 minutos. Em seguida, para a visualização da reação, os cortes foram incubados com 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloro (DAB), durante cinco minutos, e contracorados com hematoxilina de Mayer, por cinco minutos. Os cortes foram então lavados, desidratados, diafanizados e cobertos com lamínula histológica para posterior avaliação à microscopia óptica.

Solução tampão TRIS foi utilizada para a lavagem dos cortes entre as etapas do procedimento imunistoquímico. Fragmentos de placenta humana e de carcinoma mamário humano foram utilizados como controle positivo para as reações referentes aos anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2, respectivamente (Figura 10). Como controle negativo foi utilizada a solução tampão TRIS em substituição aos anticorpos primários.

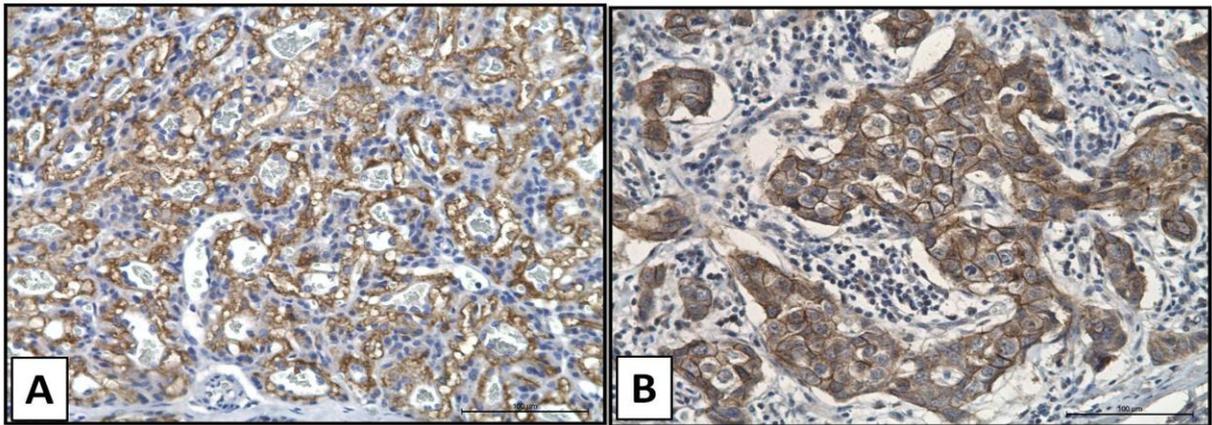


FIGURA 10- Fotomicrografia dos controles positivos para os anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2. **A)** Placenta humana com imunomarcção positiva para anti-EGFR. IHQ, objetiva 10x. **B)** Carcinoma mamário humano com imunomarcção positiva para anti-c-ErbB2. IHQ, objetiva 10x.

No estudo imunistoquímico foram avaliadas a intensidade e a distribuição da imunomarcção de EGFR e c-erbB2. À intensidade da imunomarcção, em membrana ou citoplasma, seguiram-se critérios adaptados de Looper et al.²⁰, Hendrix e Newkirk³⁵, Bilous et al.⁴⁵ e Sabbatini et al.⁴⁶, com a aplicação dos escores 0 a 3+, em que 0 refere-se a ausência de imunocoloração; 1+ imunomarcção fraca ou discreta, 2 + imunomarcção intermediária ou moderada; e 3+ imunomarcção forte ou acentuada (Figura 11). A imunomarcção para anti-EGFR e anti-c-ErbB2 no CCE de cães foi considerada negativa ou normal quando atribuídos os escores 0 e 1+. De outra parte, quando atribuídos os escores 2+ e 3+, a imunocoloração foi considerada aumentada para esses anticorpos.

Para a avaliação da distribuição da imunomarcção de EGFR e c-ErbB2 foi utilizada uma pontuação adaptada de Looper et al.²⁰, Hendrix e Newkirk³⁵, Bilous et al.⁴⁵ e Sabattini et al.⁴⁶, que levou em consideração a porcentagem de células neoplásicas positivas em cada amostra, empregando-se escores de um a quatro, em que um refere-se a 1-25%, dois a 26-50%, três a 51-75%, e quatro a mais de 76% de células imunomarcadas.

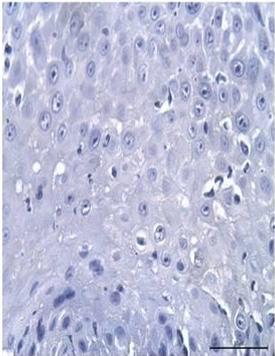
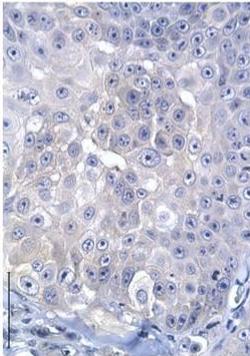
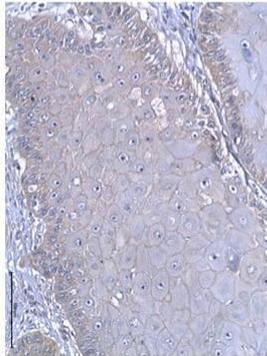
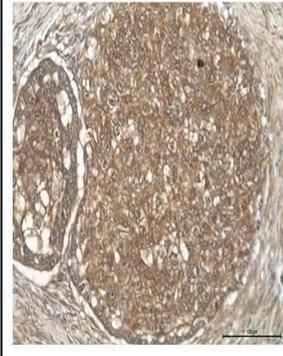
ESCORE DE INTENSIDADE			
Negativo (0-)	Discreto (1+)	Moderado (2+)	Acentuado (3+)
50µm 	50µm 	100µm 	100µm 

FIGURA 11- Escores de intensidade de imunomarcção para os anticorpos anti-EGFR e anti-c-ErbB2.

As variáveis categóricas do estudo epidemiológico, incluindo sexo, idade, raça e localização anatômica, foram analisadas descritivamente quanto as suas distribuições e apresentadas graficamente por Box-plots. Investigou-se a correlação entre a imunexpressão e distribuição da marcação de EGFR e c-ErbB2 no CCE canino e sua classificação histológica, assim como a correlação entre as duas proteínas utilizando o teste de Spearman.

O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ($\alpha = 0,05$) e os pacotes estatísticos utilizados foram o SPSS for Windows, versão 19.0 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp) e o pacote estatístico R (Versão 3.3.1 – 2016 – The R Foundation for Statistical Computing).

6. RESULTADOS

Quanto ao estudo epidemiológico, todos os cães eram domiciliados, porém nem todos os registros continham informação sobre o tipo de moradia (casa ou apartamento). Dos 70 casos, 52,2% (n=37) dos cães eram machos, enquanto 47,8% (n=33) eram fêmeas. Quanto a idade, foram consideradas três faixas etárias, sendo animais jovens (até dois anos), adultos (de três a oito anos) e idosos (acima de nove anos). Nesse contexto, a faixa etária média de cães com CCE foi de animais adultos, que representaram 51,43% (n=36) dos casos estudados.

No levantamento epidemiológico racial foram verificadas 16 raças de cães portadores de CCE, sendo as raças Pit Bull (42,8%, n=30) e Boxer (10%, n=7) a primeira e a terceira mais prevalentes. Os animais sem raça definida (SRD) representaram o segundo grupo de cães de maior prevalência para o CCE (22,8%, n=16) (Figura 12).

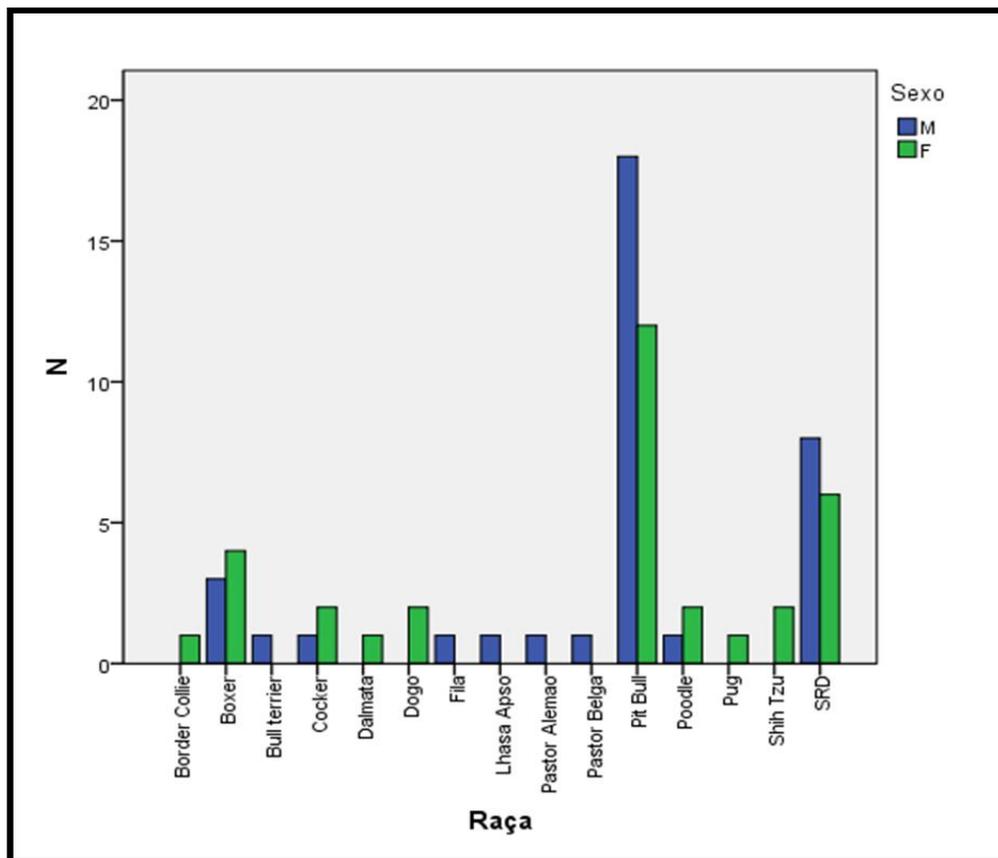


FIGURA 12- Gráfico demonstrando a relação entre o gênero e as raças de cães obtidos no levantamento epidemiológico, no período de 2006 a 2015.

Outro parâmetro avaliado neste estudo foi a localização anatômica de ocorrência do CCE em cães, sendo verificadas 14 localizações diferentes. Os locais de ocorrência mais

comuns foram o prepúcio (21,2%), abdômen (19,2%), mama (11,5%), bolsa escrotal (9,6%) e região perianal (9,6%) (Figura 13 e 14).



FIGURA 13- Fotomicrografia de carcinoma de células escamosas na pele de um cão. Lesões produtivas (cabeça de seta) e erosivas (setas) na pele da região abdominal, com sangramento fácil.

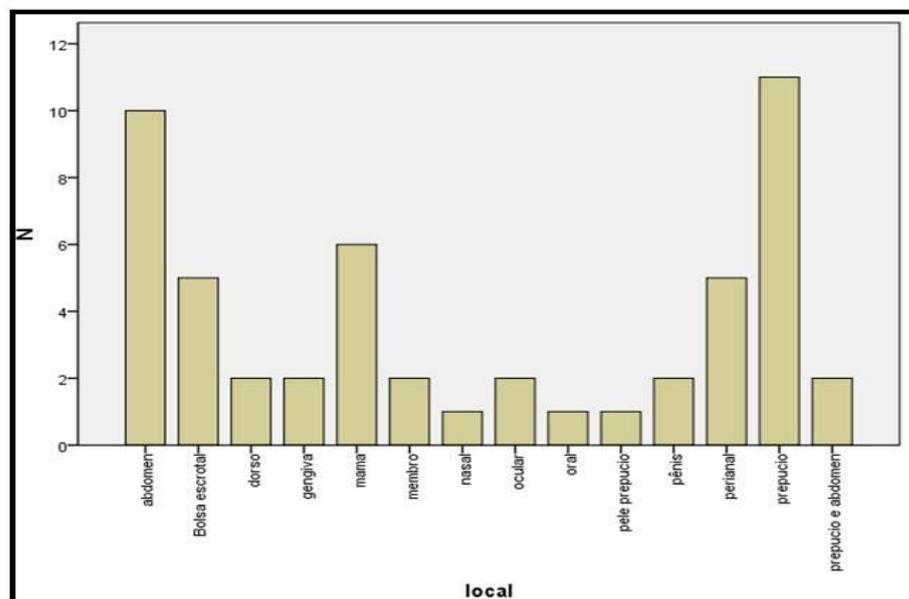


FIGURA 14- Distribuição das localizações anatômicas de ocorrência do CCE nos cães provenientes do setor de Patologia Animal da EVZ/UFG, no período de 2006 a 2015.

De acordo com os critérios histopatológicos avaliados (Figura 15), das 70 amostras avaliadas, 28 (40%) foram classificadas como CCE canino bem diferenciados (BD), 24 (34,3%) moderadamente diferenciados (MD) e 18 (25,7%) pobremente diferenciados (PD).

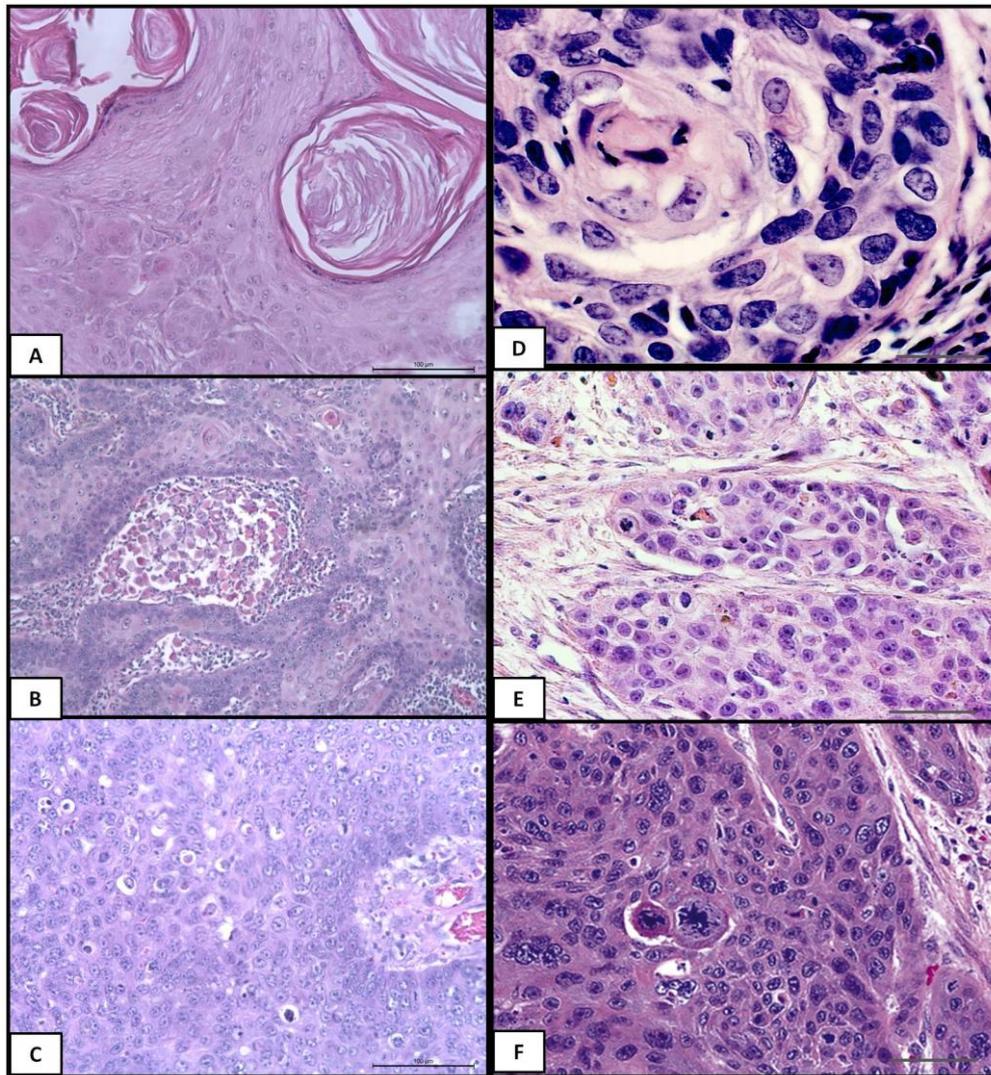


FIGURA 15- Fotomicrografia das graduações histológicas consideradas para o CCE canino. **A)** CCE bem diferenciado. Presença de cordões celulares (seta) e pérolas de queratina (cabeça de seta). HE. Objetiva 20X; **B)** CCE moderadamente diferenciado. Padrão desarranjado e ocasionais cordões neoplásicos. HE. Objetiva 10x. **C)** CCE pouco diferenciado. Ausência de arranjo em ilhas e cordões de células neoplásicas. HE. Objetiva de 40x. **D)** CCE bem diferenciado. Células neoplásicas com discreta anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. HE. Objetiva 100x. **E)** CCE moderadamente diferenciado. Moderada anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Presença de figura de mitose. HE. Objetiva 40x. **F)** CCE pouco diferenciado. Acentuada anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Presença de figuras de mitose atípicas. HE. 40x.

Na avaliação imunoistoquímica para EGFR, a intensidade de imunomarcção positiva foi observada em 33 (54,1%) das 70 amostras pesquisadas. Todos os CCE positivos (escores 2+ e 3+) apresentaram padrão de imunomarcção em membrana plasmática com concomitante positividade citoplasmática. No epitélio normal, a expressão foi confinada à camada de células basais. Entretanto, no epitélio displásico adjacente e neoplásico houve marcação uniforme em todas as camadas do epitélio. A derme relativamente acelular apresentou pouca positividade para EGFR, exceto em determinados apêndices dérmicos, como na periferia das glândulas sebáceas (Figura 16)

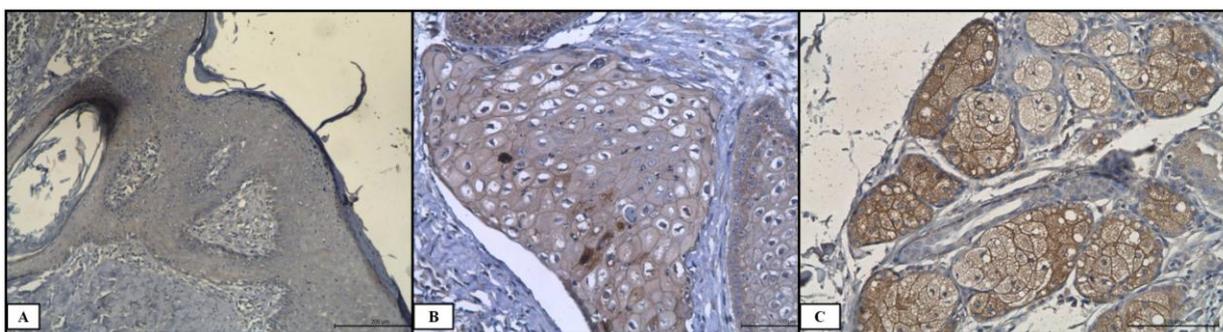


FIGURA 16- Fotomicrografia de CCE canino. **A)** Epitélio displásico adjacente a área neoplásica demonstrando distribuição uniforme de imunomarcção anti-EGFR nas diferentes camadas celulares. IHQ, objetiva 4x. **B)** Imunorreatividade positiva (3+) para anti-EGFR. Marcação em membrana plasmática com concomitante positividade citoplasmática. IHQ, objetiva 10x. **C)** Positividade para anti-EGFR em glândulas sebáceas. IHQ, objetiva 10x.

Quanto ao escore de distribuição da imunomarcção de EGFR nas amostras de CCE estudadas, 27 (38,6%) apresentaram escore um, com até 25% das células neoplásicas imunomarcadas. Por outro lado, 20 (28,6%) amostras apresentaram escore de distribuição quatro, com mais 76% das células imunomarcadas. O escore dois e três com distribuição de 26-50% e 51-75% representaram 16 (22,9%) e 7(10%) das células marcadas, respectivamente, totalizando os 70 casos estudados (Figura 17).

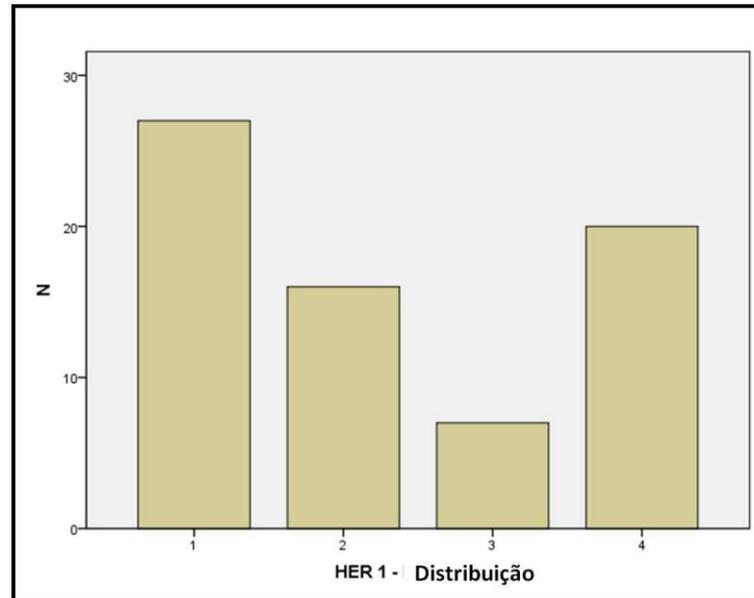


FIGURA 17- Distribu o dos casos de CCE avaliados considerando os escores de distribu o da imunomarca o imunoistoqu mica para anti-EGFR.

A avalia o da intensidade de imunoeexpress o de c-erbB2 nos casos de CCE estudados demonstrou que 35 dos 70 tumores (50%) apresentaram escore de imunocolora o 2+ ou 3+, consideradas positivas, para essa prote na e os demais 35 (50%) apresentaram escore de imunocolora o 0 ou 1+, consideradas negativas para a marca o anti-c-erbB2. O padr o de marca o celular encontrado foi predominantemente citoplasm tico, associado ou n o   marca o na membrana plasm tica. Tanto as camadas basais quanto as superficiais apresentaram imunocolora o, esta mais evidente nas c lulas de superf cie (Figura 18).

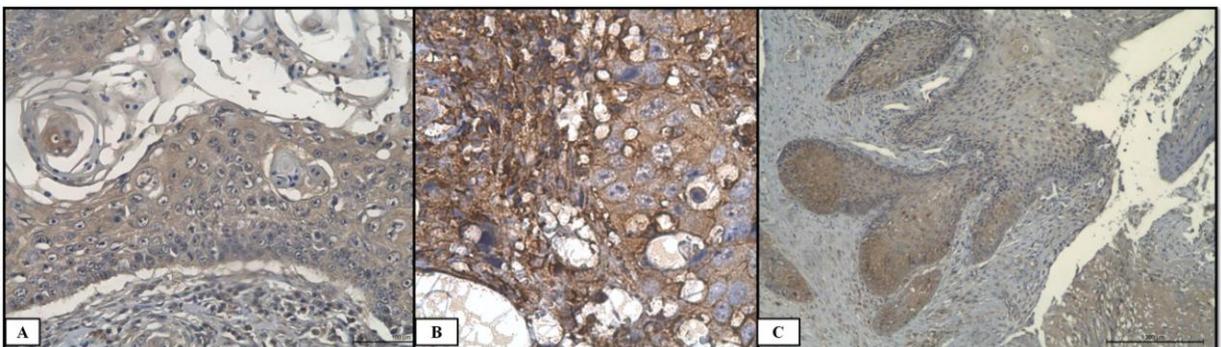


FIGURA 18- Fotomicrografia de CCE canino com imunomarca o para anti c-erbB2. **A)** Imunorreatividade predominantemente citoplasm tica em CCE moderadamente diferenciado. IHQ, objetiva 10x. **B)** Imunorreatividade positiva em CCE pobremente diferenciado. IHQ, objetiva 10x. **C)** Camadas basais e superficiais marcadas para anti-c-erbB2. IHQ, objetiva 4x.

A distribuição da imunomarcaç o de c-erbB2 foi mais observada no escore um (n=24; 34,3%), o qual marcou at  25% das c lulas neopl sicas. Do mesmo modo, 19 (27,1%) das amostras apresentaram escore de distribui o dois (26-50%), seguidos pelos escores quatro (n=18; 25,7%) e tr s (n=9; 12,9%) (Figura 19).

Neste estudo, al m da an lise das vari veis epidemiol gicas foi realizada a correla o entre a classifica o histol gica e os escores avaliados no estudo imunoistoqu mico. A correla o entre a classifica o histol gica e a imunorreatividade positiva do EGFR demonstrou, pelo teste de Spearman, que a express o da prote na tende a aumentar quando o grau de malignidade aumenta. Dessa forma, tumores pobremente diferenciados apresentam maiores escore de imunomarca o para EGFR. A correla o foi positiva ($r=0,26$) e significativa ($p=0,02$) (Tabela 1).

Em contrapartida, n o foi observada correla o entre a classifica o histol gica do CCE e a intensidade de marca o de c-erbB2 ($r=0,02$; $p=0,83$) (Tabela 1), indicando que as vari veis s o independentes.

J  quando avaliada a ocorr ncia de correla o entre o aumento da imunorreatividade de EGFR e c-erbB2, foi constatada baixa correla o positiva ($r=0,21$), n o havendo diferen a entre as vari veis ($p=0,06$) (Tabela 1).

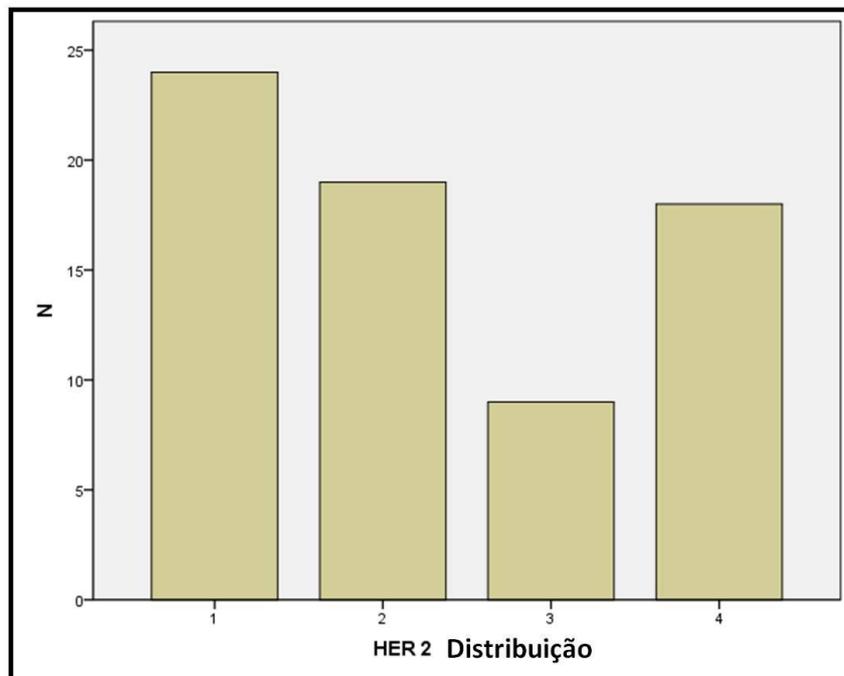


FIGURA 19- Distribui o dos casos de CCE avaliados considerando os escores de distribui o da imunomarca o imunoistoqu mica para anti-c-erbB2.

TABELA 1- Correlação entre EGFR e c-erbB2 e os diferentes graus de classificação histológica do CCE em cães, de acordo com a intensidade de imunomarcção

	R	P
Classificação histológica X EGFR	0,26	0,02
Classificação histológica X c-erbB2	0,02	0,83
EGFR X c-erbB2	0,21	0,06

Correlação de Spearman $-1 \leq r \leq 1$, nível de significância $p < 0,05$.

A análise da correlação também foi utilizada para verificar, em ambos os anticorpos, se um maior número de células neoplásicas marcadas positivamente (porcentagem de células imunorreativas) está relacionada a maior grau de indiferenciação celular. Os resultados indicam que não há relação entre percentual de células imunomarcadas e grau de diferenciação histológica do CCE em cães. O mesmo foi observado na análise de correlação entre a porcentagem de células marcadas para ambos os receptores (Tabela 2).

TABELA 2- Correlação entre EGFR e c-erbB2 e os diferentes graus de classificação histológica do CCE em cães, de acordo com o percentual de marcação

	R	P
Classificação histológica X % de células marcadas EGFR	-0,09	0,42
Classificação histológica X % de células marcadas c-erbB2	0,05	0,66
% de células marcadas EGFR X % de células marcadas c-erbB2	0,02	0,32

Correlação de Spearman $-1 \leq r \leq 1$, nível de significância $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

O CCE é uma neoplasia comum em cães, podendo ocorrer em animais jovens, porém a incidência aumenta com a idade^{49,76}. Segundo a literatura, há maior ocorrência em cães adultos, com idade igual ou superior a cinco anos, havendo casos relatados em animais com 15 anos de idade⁷⁶. A faixa etária dos animais portadores de CCE encontrada no levantamento epidemiológico deste estudo refere-se a animais adultos, semelhante ao descrito na literatura. A ocorrência do CCE é descrita como independente do gênero^{74, 79,80} e essa condição foi confirmada no levantamento epidemiológico. Dos 70 casos avaliados, 52,2% dos animais eram machos e 47,8% fêmeas, havendo pouca diferença quanto ao gênero para o desenvolvimento da neoplasia. Uma suposição para essas duas ocorrências deve-se ao fato de

que animais jovens, independente do gênero, inspiram maiores cuidados dos seus tutores e passam grande parte do tempo em locais mais protegidos contra as ações climáticas. Ao passo que, quando esses animais atingem a idade adulta, seus tutores permitem que os mesmos fiquem expostos ao sol por longos períodos.

Sabe-se que o desenvolvimento das lesões cutâneas está associado à exposição contínua à radiação ultravioleta emitida pela luz solar, e com pele hipopigmentada^{67,80}. Em cães, essa neoplasia é mais frequente na pele da região da cabeça, abdômen, membros, períneo e dígitos¹³. Nos casos em que a neoplasia envolve as pálpebras e a região periocular, observa-se a ocorrência de inflamações crônicas, que possivelmente predispõem a um microambiente favorável ao desenvolvimento de lesões displásicas e posteriormente a progressão para o CCE⁷⁶. Além disso, animais que residem em ambientes com elevadas taxas de poluição, ou ainda, são expostos a agentes químicos, como por exemplo, produtos de limpeza por longos períodos, parecem mais predispostos ao desenvolvimento do CCE na cavidade nasal^{69,72}. As localizações anatômicas encontradas neste estudo foram, em grande parte, distribuídas pela região abdominal, incluindo áreas de prepúcio em machos e mama nas fêmeas, assim como bolsa escrotal e região perianal. Uma explicação para a grande ocorrência do CCE nessas regiões atribui-se ao fato desses animais costumeiramente passarem longos períodos deitados ao sol em posição de decúbito lateral e dorsal, associado à rarefação pilosa observada nessas localizações.

Nas diferentes espécies domésticas, os animais de raças com pelo curto e pele branca ou albina apresentam incidência mais elevada de CCE⁶⁴. Em cães, as raças Dálmata, Pit Bull, Bull Terrier e Boxer são as mais acometidas^{13,14}. De forma semelhante, no levantamento de dados sobre a condição racial, obteve-se grande número de casos de CCE em cães das raças Pit Bull e Boxer. Neste estudo não foi possível fazer o levantamento de dados sobre o ambiente onde os animais habitavam (casa ou apartamento). Apesar disso, temos que os animais das referidas raças são considerados cães de médio a grande porte e geralmente residem em ambientes com área externa, devido ao seu tamanho. Essa hipótese justifica a possível exposição solar prolongada. No mesmo sentido, os cães SRD são maioria nas habitações brasileiras^{73,74} e constituíram grande parte dos casos de CCE estudados, sendo as mesmas premissas de ocorrência consideradas a esses cães.

A investigação da relação entre a perda de diferenciação morfológica e a expressão aumentada de proteínas relacionadas ao crescimento e diferenciação celular tem sido relevante para a compreensão do comportamento neoplásico e posterior estabelecimento de terapias^{46,95}. Estudos imunoistoquímicos em epitélios normais mostraram redução na

expressão de EGFR em camadas progressivamente superficiais da epiderme intacta, com marcada imunomarcagem em queratinócitos basais e pouca ou nenhuma em células da camada espinhosa superior ou no estrato córneo^{10,21}. Em contraste, nas amostras de CCE deste estudo verificou-se imunomarcagem aumentada de maneira uniforme, desde as camadas basais até as superficiais. Em queratinócitos normais, a divisão e diferenciação celular se dá nas células basais e a medida em que amadurecem, migram para a superfície. Dessa forma, a presença da imunocoloração em células basais é justificada. Entretanto, nas células displásicas e neoplásicas, a presença de imunomarcagem em todas as camadas de células pode ser explicada pela superexpressão de EGFR aliado às inúmeras desordens associadas à malignidade, como resistência aos estímulos a apoptose.

Em relação ao padrão de marcação IHQ nos queratinócitos neoplásicos, um estudo encontrou que as células EGFR positivas apresentam coloração em membrana celular e citoplasma³⁵, o que também foi constatado nesta pesquisa. O padrão de marcação em membrana observado para EGFR corresponde a sua localização transmembrana. Contudo, a imunomarcagem constatada também no citoplasma já foi relatada em outras pesquisas e pode corresponder a moléculas recém-biosintetizadas no complexo de Golgi ou ao mecanismo de tráfego, onde o complexo proteico é deslocado ao interior citoplasmático, mantendo, mesmo que desregulada, a sua função de sinalização e é associado a maior agressividade tumoral.

Ao contrário disso, o resultado deste estudo demonstra que mesmo baixa, há correlação entre o grau de diferenciação do CCE e o aumento da expressão de EGFR. Em contraste, um estudo apontou correlação negativa entre o grau de diferenciação do CCE e a intensidade de expressão de EGFR, enquanto que em outra pesquisa a expressão de EGFR não foi correlacionada à pouca diferenciação morfológica^{17,69}. Por isso, é interessante que ensaios quantitativos comparando os níveis de positividade com o das células equivalentes normais sejam aplicados.

Em relação ao padrão de marcação celular para o anti-c-erbB2, o resultado foi distinto ao observado para EGFR. O padrão de imunomarcagem encontrado foi predominantemente citoplasmático, associado ou não à marcação na membrana plasmática. Tanto as camadas basais quanto as superficiais apresentaram imunomarcagem da proteína, sendo evidentes nas células de superfície. Outro estudo realizado por Torabizadeh et al.⁷⁹, em que a técnica de FISH foi utilizada para determinar a expressão de c-erbB2 em tumores colorretais humanos, a coloração de membrana foi associada à amplificação de genes da molécula de c-erbB2, mas o mecanismo de coloração citoplasmática não foi identificado. A descoberta de que essa proteína é expressa principalmente em superfícies de tecidos

cl clinicamente normais sugere que c-erbB2 seja preferencialmente expressa por células epiteliais pós-mitóticas diferenciadas.

Diferentemente ao ocorrido com o EGFR, a imunomarcção de c-erbB2 não apresentou correlação com os diferentes graus histológicos do CCE em cães. Uma pesquisa realizada por Seo et al.³⁹ demonstrou qualitativa e quantitativamente pela avaliação IHQ e dois métodos de FISH, que c-erbB2 não é significativamente associado ao comportamento agressivo do carcinoma colorretal em humanos. Em adenomas e carcinomas mamários caninos, a avaliação da expressão de c-erbB2 por PCR demonstrou significativo aumento dessas proteínas em relação ao tecido mamário normal. Todavia, quando a mesma avaliação foi realizada por IHC não foi possível determinar tal significância⁷⁸. Ainda, os relatos da expressão aumentada de c-erbB2 variam de 0-47% no CCE-CP em humanos^{15, 20, 25}. Acredita-se que a diversidade de resultados encontrados em estudos anteriores esteja relacionado a expressão “tardia” dessa proteína por células epiteliais pós-mitóticas.

Um estudo realizado em epitélio ocular normal humano visando compreender o padrão de marcação de EGFR, c-erbB2 e c-erbB3, verificou padrão de marcação basal de EGFR enquanto para c-erbB2 o padrão de marcação encontrado foi nas camadas mais superficiais¹⁰, à semelhança dos resultados desta pesquisa. Ainda, em outro estudo realizado em amostras de CCE oculares de equinos, visando a verificação da expressão de EGFR e c-erbB2, foram observados padrões de marcação similares em células neoplásicas³⁵. A correlação positiva entre EGFR e c-erbB2 observada no referido estudo sugere que o EGFR seja expresso no estágios iniciais da diferenciação celular e o c-erbB2 preferencialmente expresso por células epiteliais pós-mitóticas diferenciadas. Assim, acredita-se que o aumento na expressão do c-erbB2 seja diretamente proporcional ao aumento de EGFR.

Pesquisas anteriores referentes aos receptores de crescimento epidérmico elucidam, na maioria dos casos, o aumento ou não da imunoexpressão aliado a outros parâmetros, como influência na atividade mitótica e/ou grau de diferenciação neoplásica, assim como sua correlação com outras proteínas envolvidas no processo de crescimento tumoral. Os estudos realizados nessa pesquisa incluíram a correlação da porcentagem de células neoplásicas marcadas distribuídas na área tumoral e o grau de diferenciação. Acreditava-se que nos casos de CCE pouco diferenciado houvesse maior percentual de células neoplásicas marcadas. Contudo, os resultados obtidos indicam que não há relação entre o percentual de células imunomarcadas e o grau de diferenciação histológica dos CCE em cães.

8. CONCLUSÕES

Conclui-se que há propensão de que o aumento na imunexpressão de EGFR seja diretamente proporcional ao grau de diferenciação do CCE, sendo que o mesmo não ocorre com a imunomarcção de c-erbB2. Também, os CCE em cães parecem apresentar aumento simultâneo da imunomarcção dos receptores de EGF.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do exposto, infere-se que a técnica de IHQ é um método laboratorial auxiliar indispensável ao diagnóstico patológico em muitas situações. Porém, devido às múltiplas variáveis envolvidas, deve ser utilizada com prudência e sempre dentro de um contexto completo de informações, preferencialmente em certos casos, com o auxílio de outras técnicas complementares de diagnóstico. As variações nas técnicas de detecção e nos métodos de interpretação da expressão aumentada de EGFR e c-erbB2 contribuem para uma divulgação variada de resultados em muitos tipos de câncer, incluindo o CCE nas diferentes espécies.

Embora a IHQ constitua uma das técnicas comumente utilizadas para avaliar os níveis protéicos de EGFR no tecido de diferentes tumores, seu método é estritamente qualitativo, sem sistema de pontuação consensual validado, com interpretação subjetiva que avalia apenas a presença do antígeno e não a atividade da proteína. Além disso, a IHQ mostra uma imagem não funcional do estado celular, quando é cada vez mais evidente que o EGFR e o c-erbB2 são parte de um sistema dinâmico, onde sua localização e funcionalidade pode ocorrer em diferentes compartimentos celulares. Assim, para uma abordagem dinâmica da funcionalidade de das proteínas envolvidas é relevante a avaliação conjunta dos níveis da proteína pela expressão de seu RNAm, utilizando a técnica de PCR.

O carcinoma das células escamosas é uma neoplasia maligna da epiderme, relativamente comum em homens e animais, podendo ter ampla variedade de formas clínicas e morfológicas. Diante do conhecimento de todos os mecanismos que envolvem o seu desenvolvimento, pode-se lançar mão de tratamentos eficientes que atuem somente nas células alteradas, privando as normais de injúria, levando a menor efeito colateral, com consequente melhor qualidade de vida ao paciente portador da doença.

Em medicina veterinária, os dados sobre a resposta à terapia são limitados e os resultados deste estudo contribuem para a avaliação da importância da imunomarcção de EGFR e c-erbB2 no CCE. Ainda, as respostas alcançadas atestam que a via de sinalização de

EGFR está possivelmente envolvida na progressão e diferenciação maligna do CCE e que a sua expressão está ligada a ativação e expressão de c-erbB2.

REFERÊNCIAS

1. Martano, M., et al. "Nuclear morphometry in canine acanthomatous ameloblastomas and squamous cell carcinomas." *European journal of histochemistry: EJH* 50.2 (2006): 125.
2. Meuten DJ. *Tumors in Domestic Animals*. John Wiley & Sons; 2008. 803 p.
3. Kraegel S, Madewell B, Ettinger S J, Feldmann E C. Tumores Da Pele. In: *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. 5ed ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 555–7.
4. Looper JS, Malarkey DE, Ruslander D, Proulx D, Thrall DE. Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas. *Vet Comp Oncol*. 1 de março de 2006;4(1):33–40.
5. Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*. julho de 2005;124(1):71–6.
6. Peña L, Gama A, Goldschmidt MH, Abadie J, Benazzi C, Castagnaro M, et al. Canine mammary tumors: a review and consensus of standard guidelines on epithelial and myoepithelial phenotype markers, HER2, and hormone receptor assessment using immunohistochemistry. *Vet Pathol*. janeiro de 2014;51(1):127–45.
7. Gaffney DC, Soyer HP, Simpson F. The epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma: An emerging drug target. *Australas J Dermatol*. 1 de fevereiro de 2014;55(1):24–34.
8. LEITE, C., Costa, J. V. G., Callado, R. B., Torres, J. N. L., & Lima, R. C. P. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista brasileira de Oncologia Clínica*. 2012;8(29).
9. Perrone F, Losa M, Lagonigro MS, Pilotti S. Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*. outubro de 2006;126(4):618.
10. Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV. Protein tyrosine phosphatases: properties and biological functions. *Quím Nova*. dezembro de 2003;26(6):896–900.
11. Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. abril de 2007;19(2):117–23.
12. Wu W, O'Reilly MS, Langley RR, Tsan RZ, Baker CH, Bekele N, et al. Expression of epidermal growth factor (EGF)/transforming growth factor- α by human lung cancer cells determines their response to EGF receptor tyrosine kinase inhibition in the lungs of mice. *Mol Cancer Ther*. 1 de outubro de 2007;6(10):2652–63.
13. Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*. 13 de outubro de 2000;103(2):211–25.

14. Lurje G, Lenz H-J. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*. 2009;77(6):400–10.
15. Nair P. Epidermal growth factor receptor family and its role in cancer progression. *Curr Sci*. 2005;88(6):890–8.
16. Faleiro MR, Toledo DC, Rodrigues MMP, Amorim RL, Brito LAB, Damasceno AD, et al. Expressão de uPAR na próstata canina normal e com lesões proliferativas. *Ciênc Anim Bras*. 28 de fevereiro de 2013;14(2):237–44.
17. Pinho SS, Carvalho S, Cabral J, Reis CA, Gärtner F. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. *Transl Res J Lab Clin Med*. março de 2012;159(3):165–72.
18. Liu Z, Carvajal M, Carraway CA, Carraway K, Pflugfelder SC. Expression of the receptor tyrosine kinases, epidermal growth factor receptor, ErbB2, and ErbB3, in human ocular surface epithelia. *Cornea*. janeiro de 2001;20(1):81–5.
19. Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications. *Mol Biol Int*. 2014;2014:852748.
20. de las Mulas JM, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Cajal SR y. Oncogene HER-2 in Canine Mammary Gland Carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*. 1 de agosto de 2003;80(3):363–7.
21. Higgins RJ, Dickinson PJ, LeCouteur RA, Bollen AW, Wang H, Wang H, et al. Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR α and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J Neurooncol*. 1 de maio de 2010;98(1):49–55.
22. Shiomitsu K, Johnson CL, Malarkey DE, Pruitt AF, Thrall DE. Expression of epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor in malignant canine epithelial nasal tumours*. *Vet Comp Oncol*. 1 de junho de 2009;7(2):106–14.
23. Sabattini S, Mancini FR, Marconato L, Bacci B, Rossi F, Vignoli M, et al. EGFR overexpression in canine primary lung cancer: pathogenetic implications and impact on survival. *Vet Comp Oncol*. 1 de setembro de 2014;12(3):237–48.
24. Terragni R, Gardini AC, Sabattini S, Bettini G, Amadori D, Talamonti C, et al. EGFR, HER-2 and KRAS in Canine Gastric Epithelial Tumors: A Potential Human Model? *PLOS ONE*. 15 de janeiro de 2014;9(1):e85388.
25. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL, Muller GH. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology7: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Elsevier Health Sciences; 2013. 950 p.
26. S DCR, De Nardi AB. *Oncologia em cães e gatos*. 1ª ed. São Paulo: Roca; 2009.
27. Bardagí M, Fondevila D, Ferrer L. Immunohistochemical Detection of COX-2 in Feline and Canine Actinic Keratoses and Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *J Comp Pathol*. janeiro de 2012;146(1):11–7.

28. INCA. Ministério da Saúde. Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer [Internet]. 2008 [citado 20 de março de 2015]. Available at: Disponível em: <http://www.inca.com.br>
29. Morris J DJ. Oncologia em pequenos animais. São Paulo: Roca; 2007.
30. Withrow SJ, Vail DM. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology - Text and VETERINARY CONSULT Package. Elsevier Science Health Science Division; 2006. 846 p.
31. da Silva EO, Green KT, Wasques DG, Reis ACF dos, Bracarense APFRL. Metastatic primary lung tumor in three dogs. Semina Ciênc Agrár. 28 de fevereiro de 2013;33(6Supl2):3271–8.
32. Abreu C da C, Pontes KC de S, Machado JP, Carvalho TB de, Eleotério RB. CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CÓRNEA DE CÃO RELATO DE CASO. An SIMPAC [Internet]. 18 de maio de 2015 [citado 26 de outubro de 2016];5(1). Available at: <https://academico.univicosa.com.br/revista/index.php/RevistaSimpac/article/view/121>
33. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. J Natl Cancer Inst. 20 de fevereiro de 2008;100(4):261–9.
34. Akhalaya MY, Maksimov GV, Rubin AB, Lademann J, Darwin ME. Molecular action mechanisms of solar infrared radiation and heat on human skin. Ageing Res Rev. julho de 2014;16:1–11.
35. Montagner S, Costa A. Molecular basis of photoaging. An Bras Dermatol. julho de 2009;84(3):263–9.
36. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma [Internet]. 2012 [citado 8 de novembro de 2016]. Available at: <http://www.jci.org/articles/view/57415/pdf>
37. Hofbauer GFL, Bouwes Bavinck JN, Euvrard S. Organ transplantation and skin cancer: basic problems and new perspectives. Exp Dermatol. junho de 2010;19(6):473–82.
38. Wu X, Nguyen B-C, Dziunycz P, Chang S, Brooks Y, Lefort K, et al. Opposing roles for calcineurin and ATF3 in squamous skin cancer. Nature. 20 de maio de 2010;465(7296):368–72.
39. Castro APBM. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. J Pediatr (Rio J). novembro de 2006;82(5):S166–72.
40. Martin CK, Tannehill-Gregg SH, Wolfe TD, Rosol TJ. Bone-Invasive Oral Squamous Cell Carcinoma in Cats Pathology and Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein. Vet Pathol Online. 1 de janeiro de 2011;48(1):302–12.
41. Patel A, Forsythe PJ. Saunders Solutions in Veterinary Practice: Small Animal Dermatology. Elsevier Health Sciences; 2008. 388 p.

42. Moriello KA, Diesel A. *Small Animal Dermatology, Advanced Cases: Self-Assessment Color Review*. CRC Press; 2013. 279 p.
43. Bedoya S a. O, Conceição LG, Vitoria MIV, Loures FH, Valente FL, Amorim RL, et al. Characterization of types I and III collagen in the stroma of cutaneous squamous cell carcinoma in dogs. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec.* fevereiro de 2016;68(1):147–54.
44. Jr A, De HL. Cytokeratins. *An Bras Dermatol.* abril de 2004;79(2):135–45.
45. João CF, Tinucci-Costa M, Cardilli DJ, Faria JLM, Magalhães GM, Alessi AC. E-cadherin expression in squamous cell carcinoma and basal cell tumors in dogs. *Ciênc Rural.* setembro de 2011;41(9):1611–6.
46. Mestrinho LA, Pissarra H, Faísca PB, Bragança M, Peleteiro MC, Niza MMRE. p63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Vet Pathol.* 1 de julho de 2015;52(4):614–20.
47. Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature.* 22 de abril de 1999;398(6729):714–8.
48. Tonks NK, Neel BG. From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell.* 1 de novembro de 1996;87(3):365–8.
49. Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB de, Pinto AC. Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. *Quím Nova.* janeiro de 2009;32(2):453–62.
50. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Fundamentos da Biologia Celular - 3.Ed.* 2016. 865 p.
51. Cardoso T, Silva EFE, Leal FMDA, Macagnan KL. [BDC] CÂNCER E VIA DAS PROTEÍNAS QUINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK). agosto de 2011 [citado 16 de junho de 2017]; Available at: <http://www.bdc.ib.unicamp.br/bdc/visualizarMaterial.php?idMaterial=1346>
52. Bishop AC, Buzko O, Shokat KM. Magic bullets for protein kinases. *Trends Cell Biol.* abril de 2001;11(4):167–72.
53. Costa E de BO, Pacheco C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina Ciênc Biológicas E Saúde.* 24 de dezembro de 2013;34(2):125–36.
54. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 4 de março de 2011;144(5):646–74.
55. Tomas A, Futter CE, Eden ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol.* 1 de janeiro de 2014;24(1):26–34.
56. Ali MALS, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, et al. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 1 de agosto de 2008;99(8):1589–94.

57. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang H-Z, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Expression on Survival and Pattern of Relapse in Patients with Advanced Head and Neck Carcinoma. *Cancer Res.* 15 de dezembro de 2002;62(24):7350–6.
58. Hendrix DVH, Newkirk KM. Expression of epidermal growth factor receptor and human epidermal growth factor receptor 2 in periocular squamous cell carcinomas of horses. *Am J Vet Res.* outubro de 2014;75(10):912–7.
59. Pollock NI, Grandis JR. HER2 as a Therapeutic Target in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 de fevereiro de 2015;21(3):526–33.
60. Papavasileiou D, Tosios K, Christopoulos P, Goutas N, Vlachodimitropoulos D. Her-2 Immunohistochemical Expression in Oral Squamous Cell Carcinomas is Associated with Polysomy of Chromosome 17, Not Her-2 Amplification. *Head Neck Pathol.* 22 de agosto de 2009;3(4):263–70.
61. Pollock NI, Grandis JR. HER2 as a therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 de fevereiro de 2015;21(3):526–33.
62. Seo AN, Kwak Y, Kim D-W, Kang S-B, Choe G, Kim WH, et al. HER2 Status in Colorectal Cancer: Its Clinical Significance and the Relationship between HER2 Gene Amplification and Expression. *PLoS ONE [Internet].* 30 de maio de 2014;9(5). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039475/>
63. Sardari Y, Pardis S, Tadbir AA, Ashraf MJ, Fattahi MJ, Ebrahimi H, et al. HER2/neu Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients is not Significantly Elevated. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(6):2891–6.
64. Amitay-Laish I, Stemmer SM, Lacouture ME. Adverse cutaneous reactions secondary to tyrosine kinase inhibitors including imatinib mesylate, nilotinib, and dasatinib. *Dermatol Ther.* 1 de julho de 2011;24(4):386–95.
65. Cunha SCS, Carvalho L a. V, Corgozinho KB, Holguin PG, Ferreira AMR. A utilização da radioterapia no tratamento do carcinoma de células escamosas cutâneo felino avançado. *Arq Bras Med Vet Zootec.* fevereiro de 2014;66(1):7–14.
66. Adams EJ, Green JA, Clark AH, Youngson JH. Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. *J Clin Pathol.* janeiro de 1999;52(1):75–7.
67. Volm M, Efferth T, Mattern J. Oncoprotein (c-myc, c-erbB1, c-erbB2, c-fos) and suppressor gene product (p53) expression in squamous cell carcinomas of the lung. Clinical and biological correlations. *Anticancer Res.* fevereiro de 1992;12(1):11–20.
68. Bilous M, Dowsett M, Hanna W, Isola J, Lebeau A, Moreno A, et al. Current Perspectives on HER2 Testing: A Review of National Testing Guidelines. *Mod Pathol.* 1 de fevereiro de 2003;16(2):173–82.
69. Sabattini S, Marconato L, Zoff A, Morini M, Scarpa F, Capitani O, et al. Epidermal growth factor receptor expression is predictive of poor prognosis in feline cutaneous squamous cell carcinoma. *J Feline Med Surg.* outubro de 2010;12(10):760–8.

70. Magalhães Barros R, Costa Jacobina G, Ecco R, Vasconcelos da Silva CE, Diniz Galera P. Carcinoma das células escamosas multicêntrico em cão. *Rev Bras Saúde E Produção Anim* [Internet]. 4 de janeiro de 2008 [citado 1 de julho de 2017];9(1). Available at: <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/844>
71. Belluco S, Brisebard E, Watrelot D, Pillet E, Marchal T, Ponce F. Digital Squamous Cell Carcinoma in Dogs: Epidemiological, Histological, and Immunohistochemical Study. *Vet Pathol*. 1 de novembro de 2013;50(6):1078–82.
72. Brauchle E, Johannsen H, Nolan S, Thude S, Schenke-Layland K. Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system. *Biomaterials*. outubro de 2013;34(30):7401–7.
73. Elliot KM, Mayer MN. Radiation therapy for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs. *Can Vet J*. março de 2009;50(3):309–12.
74. Riet-Correa F, Schild AL, Mendez M del C, Lemos RAA. Doenças de ruminantes e eqüinos. Varela; 2001. 999 p.
75. Canatto BD, Silva EA, Bernardi F, Mendes MCNC, Paranhos NT, Dias RA. Demographic characterization of supervised dog and cat populations in Sao Paulo city, Brazil. *Arq Bras Med Veterinária E Zootec*. dezembro de 2012;64(6):1515–23.
76. Lallo MA, Spadacci-Morena DD, Coutinho SD. COMPORTAMENTO HUMANO NA CRIAÇÃO DE CÃES E A PREVALÊNCIA DE PARASITOS INTESTINAIS COM POTENCIAL ZOONÓTICO Human behavior in dog breeding and the prevalence of intestinal parasites with zoonotic potential. *Rev Acadêmica Ciênc Anim*. 14 de junho de 2017;14(0):119–28.
77. Mesquita JA, Cavalvanti AL, Nonaka CFW, Godoy GP, Alves PM, Mesquita JA, et al. Clinical and histopathological evidence of oral squamous cell carcinoma in young patients: systematized review. *J Bras Patol E Med Lab*. fevereiro de 2014;50(1):67–74.
78. Favrot C, Welle M, Heimann M, Godson DL, Guscetti F. Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Analyses of Feline Squamous Cell Carcinoma In Situ. *Vet Pathol*. 1 de janeiro de 2009;46(1):25–33.
79. Torabizadeh Z, Nosrati A, Tahvildari S. Human Epidermal Growth Factor Receptor Expression in Colorectal Cancer and Its Relationship with Clinicopathological Characteristics. *Middle East J Dig Dis*. janeiro de 2016;8(1):24–30.
80. Burrai GP, Tanca A, De Miglio MR, Abbondio M, Pisanu S, Polinas M, et al. Investigation of HER2 expression in canine mammary tumors by antibody-based, transcriptomic and mass spectrometry analysis: is the dog a suitable animal model for human breast cancer? *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. novembro de 2015;36(11):9083–91.

ANEXOS

Anexo A – Aprovação CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 14 de dezembro de 2015.

PARECER REFERENTE AO PROJETO PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O N. 103/2015

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa

II - Identificação:

➤ **Título do projeto:** *Expressão Gênica e Imunomarcção dos Receptores De EGF (Her1 E Her2) no Carcinoma de Células Escamosas Cutâneo Canino.*

➤ **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Paula Lima Magalhães

Escola de Veterinária e Zootecnia/EVZ-UFV

☐ **Pesquisadores Participantes:**

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
Paula Lima Magalhães http://lattes.cnpq.br/7183260387145782	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Graduada	Coordenadora
Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura http://lattes.cnpq.br/8773201078957745	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Doutora	Orientadora
Ana Paula Iglesias Santin http://lattes.cnpq.br/2059115299287800	EVZ/UFV	Medicina Veterinária	Doutora	Co-Orientadora

☐ **Médico Veterinário Responsável:**

Nome	Número do CRMV
Paula Lima Magalhães	CRMV-GO nº 5987

☐ **Unidade onde será realizado:** Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás, Goiânia/GO.

☐ **Data de apresentação a CEUA:** 07/12/2015

III - Objetivos e justificativa do projeto:

O carcinoma de células escamosas (CCE) é um dos tumores cutâneos malignos mais comuns em todas as espécies animais, assim como na espécie humana, podendo acometer desde animais jovens a idosos. Tem desenvolvimento associado a fatores ambientais como exposição prolongada aos raios solares e hipopigmentação epidermal. De acordo com a literatura, 80% das neoplasias malignas têm origem em estímulos ambientais, em decorrência a exposição de carcinógenos. Apesar da etiologia multifatorial, a busca pelo esclarecimento das causas e dos mecanismos de evolução do câncer deve ser incessante, pois inúmeras neoplasias podem ser prevenidas, especialmente quando induzidas por fatores exógenos. Assim, este projeto tem por objetivo estudar o CCE cutâneo canino à luz dos diferentes padrões histomorfológicos da neoplasia, avaliando o imunofenótipo e o genótipo quanto aos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR), Her1/ErbB1 e Her2/ErbB2. Para tal, serão analisados os materiais de biopsia e necropsia do arquivo do Setor de Patologia Animal da EVZ/UFV referente ao período de 2006 a 2015. Para a descrição epidemiológica serão consideradas as informações de registro, incluindo raça, sexo, idade, número de lesões, localização anatômica, tamanho, consistência, coloração e ulceração. Quanto à avaliação histomorfológica e critérios de malignidade as lesões serão classificadas de acordo com o sistema preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Para o estudo imuno-histoquímico serão utilizados os anticorpos anti-EGFR (Her1) e anti-c-erbB-2 (Her2). Na avaliação genotípica será realizada a extração de RNAm dos blocos de parafina, utilizando reagentes comerciais, e este será submetido aos testes de RT-PCR e RT-qPCR, a

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876. Email: ceua.ufv@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



fim de avaliar a expressão gênica dos receptores de EGF (ErbB1 e ErbB2), com o intuito de melhor compreender a participação dessas proteínas nos mecanismos envolvidos na gênese, proliferação e evolução do CCE cutâneo canino. Diante dos resultados das avaliações histomorfológica, imunofenotípica e genotípica será realizado estudo de correlação entre essas avaliações, visando o melhor entendimento do comportamento biológico do CCE cutâneo canino, o que pode auxiliar clínicos veterinários em relação a prognóstico e tratamento.

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a não utilização de métodos alternativos e necessidade do número de animais:** Não se aplica.
- Grau de Invasividade:** *GI I*
- Animal utilizado e fonte de obtenção. Deixar explícita a espécie animal, o número total de animais utilizados e o número de animais para cada experimento.** Serão analisados os materiais de biopsia e necropsia de pelo menos 70 animais, os quais se encontram no arquivo do Setor de Patologia Animal da EVZ/UFG referente ao período de 2006 a 2015. Trata-se, portanto, de estudo realizado a partir de amostras colhidas em animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário- UFG.
- Materiais biológicos destes exemplares serão usados em outros projetos:** Não.
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:** Não se aplica.
- Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:** Não se aplica.
- Extração de materiais biológicos:** Não se aplica.
- Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários.** Não se aplica.
- Riscos aos professores/alunos (físicos, biológicos, psicológicos e sociais):** Não se aplica.
- Descrição do método de eutanásia (caso se aplique) e destino dos animais após a aula prática:** Não se aplica.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto a documentos:** O protocolo é composto pela Ficha de Protocolo do Projeto (p. 01-15), pelo Termo Responsabilidade assinados por todos os pesquisadores (p. 17), pela Certidão de Ata (p. 16) e por um CD com todos os itens do protocolo físico gravados em mídia digital.

VI - Parecer da CEUA:

Após apreciação dos esclarecimentos sobre as medidas que serão utilizadas para minimizar o sofrimento de animais que não se recuperarem do procedimento cirúrgico, consideramos o projeto **APROVADO**. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 28 de fevereiro de 2017.

VII - Data da reunião: 14/12/2015

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876. Email: ceua.ufg@gmail.com