UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo histológico e imunohistoquímico da expressão de Ki-67 em carcinomas das células escamosas em gatos

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Vaterinária, orientada por Professoura Doutora Mariana Batista

Filipa Maria Seabra Capaz Coelho, nº21702458

2024

UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo histológico e imunohistoquímico da expressão de Ki-67 em carcinomas das células escamosas em gatos

Versão Final

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 15/02/2024, perante júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 580/2024, de 09 de janeiro de 2024, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Margarida Alves

Arguente: Professora Doutora Maria João Soares (Egas Moniz School of Health and Science)

Orientadora: Professora Doutora Mariana Batista

Filipa Maria Seabra Capaz Coelho, nº21702458

2024

Este trabalho é dedicado à minha Mãe,

Maria João da Silva Seabra,

Pela inspiração e força que me transmitiu

para realizar este projeto e alcançar,

Finalmente, o meu sonho de infância.

"Quando sinto uma terrível necessidade de religião,

Saio à noite para pintar as estrelas".

- Vicent van Gogh

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha Instituição de ensino, a Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias e a todos os envolvidos com a Faculdade de Medicina Veterinária, pelos memoráveis 5 anos de muito esforço, estudo e aventuras. As maravilhosas memórias aqui obtidas são e sempre serão um marco importante da minha jornada para me tornar a Pessoa que desejo ser.

Os mais profundos agradecimentos ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias DNATech por todo o auxilio que prestou de modo a permitir o progresso deste projeto, desde a disponibilização das amostras como dos materiais para realizar as imunohistoquímicas, sem os quais não teria sido possível concretizar este objetivo.

Igualmente, a constante ajuda dos Professores que me acompanharam durante todo o período de realização do projeto prático como escrita da presente dissertação, foi essencial. Como tal, agradeço à Professora Mariana Batista pela sua simpatia e contínuo apoio no esclarecimento de dúvidas e na superação de dificuldades, ao Professor Pedro Faísca pela prontidão e eficácia com que trabalha, criando sempre um ambiente seguro ao seu redor para aprender e evoluir, à Professora Maria João Soares por todas as oportunidades que atenciosamente me ajudou a alcançar, com o conforto de saber que há alguém que quer o nosso genuíno sucesso e ao Professor José Catarino pela sua disponibilidade, seja para ajudar num projeto ou dizer uma palavra de motivação.

As minhas experiências no mundo da Veterinária não poderiam ter começado da melhor forma. Os meus mais profundos e saudosos agradecimentos aos profissionais que me acompanharam nos meus estágios curriculares. Na Clínica VillaAnimal, as mais do que espetaculares Drª. Mafalda Lage, Drª. Ana Lemos e Drª. Inês Santos por toda a paciência, amizade, ensinamentos (seja em veterinária, seja sobre a vida) e as minhas auxiliares preferidas Sónia Barnabé e Ana Bastos, por todas as explicações, todos os risos e todas as danças. No Hospital do Jardim Zoológico de Lisboa, agradeço ao Dr. Rui Bernardino, à Drª. Teresa Lobo e à Drª. Rafalea Fiuza pelo constante apoio, sempre disponíveis para esclarecer todas as minhas questões sobre os procedimentos médicos e sobre mim mesma. Um slay especial para a minha enfermeira Cláudia que tornou cada dia, um dia de festa. Em ambos os locais entrei uma estagiária e sai uma futura média veterinária cheia de amigos e felicidade.

Mas não teria sido possível realizar os estágios e redigir a dissertação sem os longos 5 anos de estudo. A única forma cientificamente comprovada de o aluno não disistir perante tão elevado e frequente stress é ser acompanhado pelo melhor sistema de apoio. Na Universidade, tal papel caiu nas minhas Amigas. As nossas mamãs adotivas Maridee Cervantes, a *chica mais caliente* deste universo e a fabulosa Ana Pires, que sempre nos apoiaram no nosso percurso, prontas para ajudar em tudo e viver esta grande aventura com

as suas meninas. Às minhas amigas Mónica Fernandes e Inês Nascimento, que estiveram sempre presentes nos estudos, nos ataques de pânico e de risadas. Todas as emoções possíveis de experienciar, nós vivemo-las juntas. E apesar de traumático, foi igualmente maravilhoso. Um agradecimento especial às minhas bebés, Mariana António e Rute Penim, por serem das pessoas mais especiais com quem já me cruzei. À Mariana por ser um apoio inegável em todas as situações, pelo carinho, empatia e cuidado com que sempre me tratou. À Rute por ser a melhor companheira, sempre do meu lado em todas as coisas boas e menos boas, sempre confiante nas minhas capacidades (e beleza…), o seu apoio incondicional foi sem dúvida dos mais importantes e, como tal, é uma honra ter uma pessoa tão integra e genuína como melhor amiga.

Finalmente, a mais importante fonte de força, inspiração e conforto, a Família.

Á minha melhor amiga Tata, por me adorar e apoiar, incondicionalmente.

Agradeço às minhas amigas de todas as horas, Mel, Cacau e Momo que me ajudaram pelo simples facto de existirem, por me aquecerem o colo enquanto estudava para as frequências e pelos miminhos nas sessões de choro às 4 da manhã na véspera dos exames.

Aos meus irmãos, Joana e Martim, que apesar de todas as diferenças de personalidade e objetivos de vida, são das minhas pessoas preferidas. Ao longo destes anos, quer nos momentos de maior felicidade, quer nos de maior desespero, os meus irmãos foram das únicas pessoas que realmente me perceberam e fizeram os maiores esforços por mim, tal como eu sempre fiz e farei por eles.

Um agradecimento especial, com as mais profundas e constantes saudades, à minha Mãe, Maria João, por ser a inspiração para este projeto e o verdadeiro motivo pelo qual aguentei todas as ânsias e decessões que o mesmo me trouxe. Espero que esta conclusão de precurso a deixe orgulhosa e que continue a proteger-me e cuidar de mim, mesmo que já não consigamos ver-nos e estar juntas. De modo a ajudar outros doentes oncológicos realizei este projeto e dedico-o, agora, também a ELA. Que felicidade e paz seja tudo o que te rodeia, onde quer que agora estejas a descansar.

Como o melhor fica sempre para o fim, os meus agradecimentos finais vão para a melhor pessoa que este mundo já produziu e a minha eterna pessoa preferida, o meu Pai, António Raúl. Sem ele nada disto seria possível, tudo o que foi alncançado ao longo destes 25 anos é fruto da educação e amor que o meu pai me forneceu, sempre, e de todo os esforços que fez toda a sua vida para cuidar dos seus filhos. Nunca haverá alguém mais espcial, mais bondoso, mais disponível, mais simpático, mais cuidadoso do que ele. No fim destes 6 anos de luta e alcançando, finalmente, este grande marco na minha vida, posso confiantemente afirmar, que ainda assim, ter nascido tua filha continua a ser o meu maior orgulho.

Resumo

Estudo histológico e imunohistoquímico da expressão de Ki-67 em carcinomas das células escamosas em gatos

O cancro é uma doença altamente prevalente em animais de companhia, sendo uma das suas principais causas de morte. O carcinoma das células escamosas (CCE) é um dos tumores mais comuns em gatos, levando à desfiguração e incapacitação dos animais relacionada com a progressão da doença, às sequelas terapêuticas ou mesmo à morte em casos incuráveis. Para desenvolver melhores ferramentas de diagnóstico e prognóstico, é necessário estudar a adequação de vários biomarcadores, bem como o seu comportamento dentro do tumor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a distribuição do marcador de proliferação Ki-67 em CCE de três localizações anatómicas diferentes.

Foram selecionadas 25 amostras de CCE de gatos previamente diagnosticados por análise histológica, localizadas no plano nasal (N; n=8), pavilhão auricular (E; n=10) e cavidade oral (O; n=9). O grau de malignidade foi calculado de acordo com classificações previamente validadas, com 23 casos classificados como Grau 1 e dois como Grau 2. Foi realizada imunohistoquímica indireta para quantificar o Ki-67 em seções tumorais embebidas em parafina e as lâminas foram digitalizadas e analisadas com recurso ao software QuPath (v0.4.3), através da seleção manual de quatro regiões especificas de 1) tumor (T), 2) estroma adjacente (S), 3) frente invasora tumoral (IF) e 4) superfície tumoral (TS). Os dados das contagens resultantes foram processados com SPSS (v.25) utilizando testes paramétricos e não paramétricos consoante normalidade da distribuição dos dados em cada variável. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

Os resultados demonstram que dentro de uma mesma região alvo de cada amostra individual não há diferenças estastisticamente significativas no número de células positivas para Ki-67. Quanto às comparações entre áreas, não houve diferenças de proliferação entre TS e IF. No entanto, as áreas T apresentavam significativamente mais células marcadas para Ki-67 do que as regiões S correspondentes ($p = 0,001$), embora a inspeção visual mostrasse que, nestas últimas, a marcação positiva se devia principalmente a células inflamatórias infiltradas no estroma. Finalmente, verificaram-se diferenças na marcação da IF de CCE entre a localização N e a localização E ($p = 0,032$), sugerindo uma frente invasora mais agressiva.

Este estudo demonstra que a distribuição do Ki-67 numa mesma região alvo de cada tumor é homogénea, o que pode facilitar a seleção das áreas a serem analisadas digitalmente. Em relação ao comportamento tumoral, os resultados revelaram que, embora haja proliferação observável nas células estromais adjacentes do CCE, tal deve-se à presença de células inflamatórias infiltrativas marcadas para o Ki-67, sendo que as contagens estromais

são inferiores quando comparadas com as contagens das células tumorais. Finalmente, pode concluir-se que os CCE do plano nasal parecem ter um comportamento de infiltração mais agressivo do que os seus homólogos do pavilhão auricular. A análise de mais amostras destes locais de CCE (e outros) é necessária para consolidar estas observações e associar a coloração Ki-67 a outras ferramentas de classificação de tumores.
Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas; proliferação; gatos; Ki-67; heterogeneidade; frente invasora.

Abstract

Histological and immunohistochemical study of Ki-67 expression in squamous cell carcinoma in cats

Cancer is highly prevalent in companion animals and is a major cause of death. Squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common feline tumours, leading to disfiguration and disability related to disease progression, therapeutic sequelae or death in incurable cases. To develop better diagnostic and prognostic tools, the suitability of several biomarkers needs to be studied, as well as their behaviour within the tumour. The aim of this work was to evaluate the distribution of the Ki-67 proliferation marker within SCC tumours from three different anatomical locations.

25 samples of previously diagnosed feline SCC located in the nasal plane (N; n=8), ear pinna (E; n=10) and oral cavity (O; n=9) were selected. Malignancy score was calculated according to previously validated classifications with 23 cases classified as Grade1 and two as Grade2. Indirect immunohistochemistry was performed to locate Ki-67 in paraffin embedded tumour sections. After visual observation, slides were digitalized and positively stained nucleus were identified using QuPath (v0.4.3) software by manually selecting four target areas of 1) tumour (T), 2) adjacent stroma (S), 3) invasive tumour front (IF) and 4) tumour surface (TS). Resulting data was processed with SPSS (v.25) using Wilcoxon and Kruskal-Walis or t-Student test according to the normality of data distribution. Differences were considered significant when $p<0.05$.

Results show that within the same target area in the sample, there are no differences in the number of Ki-67 positive cells, showing proliferation. Regarding comparisons between areas, there were no differences between proliferation in TS and IF. However, T areas had significantly more Ki-67 positive marked cells than their correspondent S areas ($p=0.001$), although visual inspection showed that, in the latter, positive marking was mostly due to stroma infiltrated inflammatory cells. Finally, regarding proliferation in IF, results show that, although there were no differences between proliferation between O and N and E, N SCC had more positively marked Ki-67 cells than E SCC ($p=0.032$), suggesting a more aggressive invasive front.

This study shows that Ki-67 distribution within the same target area of the tumour is homogenous, which may facilitate the selection of areas to be digitally analysed. Regarding tumour behaviour, results show that even though there is observable proliferation in SCC adjacent stromal cells, this is most likely due to infiltrative inflammatory cells and is always inferior to tumoral proliferation itself. Finally, we can conclude that nasal plane SCC seem to have a more aggressive infiltration behaviour than their: ear pinna counterparts. Analysis of

more samples from these SCC locations (and others) is required to consolidate these findings and associate Ki-67 staining with other tumour classification tools.
Palavras chave: Squamous cells carcinoma; cat; proliferation; Ki-67; heterogeneity; invasive front.

Lista de abreviaturas

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

CCB – Carcinoma das células basais

CCE – Carcinoma das células escamosas

CDKs – Proteínas quinases dependentes de ciclina

DAB − 3,3’ diaminobenzina

H_20_2 – Peróxido de hidrogénio

HRP – Peroxidase de rabanete

NETs − Armadilhas extracelulares de neutrófilos

PBS − Tampão fosfato salino

ROS – Espécies reativas de oxigénio

TEM −Transformação de epitelial/endotelial a mesenquimal

TNM – Sistema Tumor-Nódulos-Metástase

UV – Radição ultravioleta

UVA – Radiação ultravioleta A

UVB – Radiação ultravioleta B

UVC – Radiação ultravioleta C

Vs. – *Versus*

WHO – Organização Mundial de Sáude

Índice

Página

Indíce de Tabelas ……15

Indíce de Figuras ……17

Indice de Gráficos ……...19

I – Casuística clínica e descrição do estágio curricular ……..20

1. Discrição do estágio curricular na Clínica Veterinária VillaAnimal ……..20
   1.1 Distribuição da casuística por espécie animal ……,20
   1.2 Distribuição da casuística por área da medicina veterinária ……..20
      1.2.1 Medicina Clínica ……...21
      1.2.2 Medicina Preventiva ……....22
      1.2.3 Medicina Cirúrgica ……...22
      1.2.4 Medicina de Urgências ……..….22
   1.3 Exames Complementares de Diagnóstico ……....23
2. Descrição do estágio curricular no Hospital do Jardim Zoológico de Lisboa ……24
   2.1 Distribuição da casuística por classe e espécie animal ……....24
   2.2 Distribuição da casuística por áreas da medicina veterinária ……..……25
      2.2.1 Medicina Clínica ……...26
      2.2.2 Medicina Preventiva ……....26
      2.2.3 Medicina Cirúrgica e Anestesiologia.……27
      2.2.4 Medicina Alternativa ……..……..27
   2.3 Exames Complementares de Diagnóstico ……..……...28
3. Apresentação do póster científico ……28

II - Estudo histológico e imunohistoqímico da expressão de Ki-67 em carcinoma das células escamosas em gatos ……..……..……29

1. Introdução teórica ……..……29
   1.1 A etiologia do cancro ……..……29
      1.1.1 Influência genética no risco de cancro ……..…….. 29
      1.1.2 Influência genética em cancros esporádicos ……..……31
      1.1.3 As características do cancro ……...……32
         1.1.3.1 Autossuficiência em sinalização de crescimento ……..….32
         1.1.3.2 Insensibilidade a fatores inibidores de crescimento ……..…33

1.1.3.3 Evasão à morte celular ……..…….34
1.1.3.4 Potencial replicativo ilimitado ……..……..34
1.1.3.5 Angiogénese ……..……..35
1.1.3.6 Invasão e metástase ……..…….36
1.1.4 Características “emergentes” e “favoráveis” das células tumorais…….....36
1.1.4.1 Instabilidade genómica ……..……36
1.1.4.2 Inflamação promotora de tumor ……..….37
1.1.4.3 Repregramação do metabolismo energético ……..……37
1.1.4.4 Evasão da destruição pelo sistema imunitário ……..……..38
1.1.5 Microambiente ……..……39
1.2 A pele ……..……...39
1.2.1 Tumores com origem na pele ……..…….. 40
1.2.2 Incidência de cancro da pele em animais de companhia ……..……40
1.2.3 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de cancro da pele ……...……..41
1.3 Carcinoma das células escamosas ……..……...42
1.3.1 Incidência de carcinoma das células escamosas em gatos……..……..……...42
1.3.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinoma das células escamosas em gatos ……..……43
1.3.3 Patofisiologia e apresentação clínica de carcinomas das células escamosas em gatos ……..……43
1.3.4 Métodos de diagnóstico e de prognóstico ……..……..45
1.4 Biomarcadores com efeito prognóstico ……..…….47
1.4.1 Técnica de imunohistoquímica …….. 47
1.4.2 Ki-67 ……..……48
1.5 Sistemas de classificação tumoral ……..…….50
1.5.1 Sistema de classificação da Associação Mundial de Saúde……..51
1.5.2 Sistema de classificação adaptado de Bryne por Nagamine *et al.,* (2017) ……..…..53
1.6 Objetivos do presente trabalho sobre marcação de Ki-67 em CCE em gatos……..……..55
2. Materiais e métodos……..……....56
2.1. Obtenção de amostras para o projeto .....……,,.56

2.2.1 Descrição da amostra ……....56
2.2. Técnica de Imunohistoquímica ……..……57
2.3. Classificação do grau de malignidade de acordo com o sistema adaptado de Ngamine *et al.,* (2017) ……..……...59
2.4. QuPath e avaliação patológica digital ……..…….……59
2.5. Análise estatística das contagens celulares ……..……...61
3. Resultados ……..……61
3.1. Classificação visual dos CCE quanto ao grau de malignidade de acrodo com o sistema adapatado por Nagamine *et al.* (2017) ……..……..61
3.2. Resultados das contagens de marcação de Ki-67 ……..……62
3.2.1 Estudo da heterogeneidade intratumoral para a marcação da proteína Ki-67 ……..……....62
3.2.1.1 Estudo da concordância entre três contagens de marcação de Ki-67 aleatórias e entre as mesmas e a média da lâmina ……62
3.2.1.2 Estudo de comparação entre contagens aleatórias de células tumorais e a contagem “verdadeira aleatória” ……63
3.2.2 Estudo da influência do estroma na contagem “verdadeira aleatória” …….……...64
3.2.3 Estudo da relevância da frente invasora para a classificação do grau de agressividade tumoral ……..……...64
3.2.3.1 Estudo comparativo entre os resultados das contagens de marcação de Ki-67 na frente invasora com os da superfície tumoral ……..…64
3.2.3.2 Estudo comparativo entre as contagens da marcação do Ki-67 entre as contagens aleatórias e a frente invasora……...65
3.2.4 Influência de 4 variáveis (sexo, idade, localização anatómica e grau de agressividade) sobre a marcação de Ki-67 (aleatória, “verdadeira aleatória”, frente invasora e superfície tumoral) ……....66
3.2.4.1 Localização anatómica (cavidade oral, pavilhão auricular e plano nasal) Versus (Vs.) Idade e Grau de agressividade ……..……..…….66
3.2.4.2 Localização anatómica (cavidade oral, pavilhão auricular e plano nasal) Vs. Sexo (fêmea e macho) ……..……66
3.2.4.3 Sexo Vs. Idade e Grau de agressividade ……..……..66
3.2.4.4 Idade Vs. Grau de agressividade ……..……67

3.2.5 Estudo comparativo entre a localização anatómica e as contagens da marcação positiva para Ki-67 (aleatória, frente invasora e estroma) ……..……..67
4. Discussão ……..…….. 68
4.1. Estudo da homogeneidade de marcação intratumoral de Ki-67 em CCE em gatos …….……..68
4.2. Estudo da heterogeneidade da marcação de Ki-67 nas várias secções da lâmina de histopatologia de CCE em gatos ……..……72
4.3. Estado comparativo da contagem de Ki-67 na massa tumoral e no estroma associado ao tumor em CCE em gatos ……...……..……74
4.4. Marcação de Ki-67 na frente invasora e na superfície de CCE em gatos……..…..80
4.5. Estudo da influência das variáveis sexo, idade, localização anatómica e grau de agressividade sobre a marcação de Ki-67 ……...……....83
4.6. Limitações do estudo ……...…….84
4.6.1 Impossibilidade de obter follow-up .....……..……84
4.6.2 Reduzido número de amostras ……..…...84
4.6.3 Utilização de programas digitais para análise de imagem……..…..…..85
5. Conclusão ……..…….…85
Referências Bibliográficas ……..…87
Anexos ……110

Índice de Tabelas

Página

Tabela 1 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a área da medicina veterinária ……..21

Tabela 2 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a especialidade ……21

Tabela 3 – Frequência relativa e absoluta dos métodos de medicina preventiva aplicados ……22

Tabela 4 – Frequência relativa e absoluta dos procedimentos cirúrgicos realizados …….22

Tabela 5 – Frequência relativa e absoluta dos casos acordo com o tipo de urgência ……...22

Tabela 6 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de métodos de diagnóstico utilizados ……..23

Tabela 7 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a área da medicina veterinária ……...25

Tabela 8– Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a especialidade ……..…… 26

Tabela 9 – Frequência relativa e absoluta dos métodos de medicina preventiva aplicados ……...27

Tabela 10 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de cirurgias realizadas …..27

Tabela 11 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de métodos de diagnóstico utilizados …… 28

Tabela 12 – Classificação do CCE em diferentes estádios de acordo com as suas dimensões e profundidade de invasão com correspondente descrição ……...51

Tabela 13 – Classificação do CCE de acordo com a disseminação para os linfonodos, adaptado da medicina humana ……52

Tabela 14 – Classificação do CCE de acordo com a presença de metástases à distância …… …. 52

Tabela 15 – Estadiamento de acordo com a categorização do tumor segundo o sistema TNM …… 53

Tabela 16 – Sistema de classificação do grau de malignidade para CCE orais e cutâneos em cães adaptado por Nagamine *et al*. (2017) ……54

Tabela 17 – Parâmetros utilizados para contagem das células positivas das regiões tumorais aleatórias, superfície, frente invasora e estroma no porgrama QuPath…… 60

Tabela 18 – Homogeneidade intratumoral: média da percentagem de células positivamente marcadas com Ki-67 em três regiões tumorais alectórias e média da marcação tumoral total das 25 amostras, com respetivos erros padrão da média……..63

Tabela 19 – Homogeneidade intratumoral: média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente ás contagens “verdadeira aleatória” e média tumoral, com respetivos erros padrão da média……63

Tabela 20 – Heterogeneidade intratumoral: média da percentagem de células positivamente marcadas com Ki-67 em três regiões do estroma, a média da marcação estromal e tumoral total das 25 amostras, com respetivos erros padrão da média……..64

Tabela 21 – Homogeneidade intratumoral: média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente às contagens da superfície tumoral e frente invasora, com respetivos erros padrão da média……65

Tabela 22 – Homogeneidade intratumoral: média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente às contagens das regiões aleatórias e frente invasora, com respetivos erros padrão da média……...65

Índice de Figuras

Página

Figura 1 – Apresentação clínica e histológica da queratose actínica e carcinoma das células escamosas *in situ*. A- Queratose actínica num gato de pelagem branca. B- Imagem histológica da queratose actínica, coloração hematoxilina-eosina. C- Carcinoma das células escamosas do plano nasal. D- Imagem histológica do carcinoma das células escamosas do plano nasal, células marcadas com Ki-67 visível através da coloração DAB e hematoxilina de Mayer (2,5x) ……44

Figura 2 − Gradiente de marcação de Ki-67 através da coloração com DAB e Hematoxilina de Mayer. A- Marcação ausente; B- marcação bastante ligeira; C-marcação ligeira; D- marcação moderada; E- marcação evidente; F- marcação bastante evidente…….58

Figura 3 – Marcação de Ki-67 em células tumorais (A) e de neutrófilos (B), em CCE em gatos. Coloração com DAB e de contraste com hematoxilina de Mayer (objetiva 40x)…….78

Figura A1 – Póster científico intitulado “Estudo histológico e imunohistoquímico preliminar da expressão de Ki-67 em carcinomas das células escamosas em gatos”, apresentado no “The 2nd Egas Moniz One Health Symposium” (2023)……CIX

Figura A2 – As “características do cancro” ……CX

Figura A3 – Contribuição do microambiente para as “características do cancro” ……..CXI

Figura A4 – Estádios do desenvolvimento de carcinoma das células escamosas. O processo inicia-se com a hiperplasia dos queratinócitos associado a um ligeiro aumento da densidade de vasos sanguíneos. De seguida há progressão para displasia (queratinócitos morfologicamente aberrantes com elevado índice de proliferação e abundante neovascularização). Por fim, dá-se a invasão do tecido tumoral no estroma associado ao tumor
……CXII

Figura A5 – Sinalização da superfície tumoral (A) e frente invasora (B) em CCE em gatos. Coloração com DAB e hematoxilina de Mayer (2,5x) ……CXII

Figura A6 – Sistema de classificação do grau de malignidade para CCE com imagens representativas, coloração DAB e hematoxilina de Mayer. ……..CXIII

Figura A7 – Heterogeneidade intratumoral. Células neoplásicas fenotipicamente distintas devido a heterogenia genómica (diferentes cores do ADN) e epigenética (diferentes cores das células) e os componentes do microambiente que as envolve ……CXIV

Índice de Gráficos

Página

Gráfico 1 - Índice de proliferação de Ki-67 na frente invasora tumoral, da cavidade oral (O), pavilhão auricular (E) e plano nasal (N), de CCE em gatos. As barras representam média ± s.e.m. Barras com letras diferentes diferem significativamente (p<0,05) ……..68

I – Casuística clínica e descrição do estágio curricular

1. Descrição do estágio curricular na Clínica Veterinária VillaAnimal

O estágio curricular na Clínica VillaAnimal decorreu durante 3 meses e meio, de 15 de setembro de 2022 a 06 de janeiro de 2023, sob a orientação da Doutora Mafalda Lage, diretora clinica do estabelecimento. Durante o período de estágio, a autora teve a oportunidade de ser integrada em atividades práticas e teóricas de diversas componentes da medicina veterinária, centradas na medicina interna e cirúrgica de animais de companhia. Com auxílio da equipa médica, profissionais dotados de conhecimento amplo, a autora esteve presente em discussões de casos clínicos, consultas com tutores e palestras com diferentes laboratórios para consolidação da matéria teórica e estimulação do sentido crítico. Numa vertente prática, a autora teve a oportunidade de participar em procedimentos simples como preparar e familiarizar-se com diferentes medicações, escrever fichas médicas e altas clínicas, em procedimentos ligeiramente mais complexos como vacinações, colheitas de sangue e colocação de cateteres e mesmo procedimentos de maior responsabilidade como administrar e monitorizar anestesias em vários procedimentos cirúrgicos e realização de cirurgias eletivas como orquiectomias.

Através do apoio de toda a equipa de médicas e auxiliares, competências sociais como comunicação com tutores e trabalho de equipa foram também adquiridas, sendo este conjunto de valências essenciais para a autora como futura médica veterinária e como pessoa.

A casuística recolhida durante o estágio estará organizada de acordo com a espécie animal e dividida nas principais áreas da medicina exploradas, com adicional descrição dos exames diagnósticos realizados nos diferentes casos.

1.1 Distribuição da casuística por espécie animal

Durante o estágio foram examinados 294 animais, dos quais 180 pertencem à espécie canina (61%) e 114 à espécie felina (39%).

1.2 Distribuição da casuística por área da medicina veterinária

A principal área da medicina veterinária explorada foi a medicina clínica, seguida da medicina preventiva, cirúrgica e por fim, de urgências (Tabela 1). É de importância mencionar, que um mesmo animal poderá encontrar-se presente em mais do que uma destas categorias (após uma ou várias avaliações em consulta). Durante o período de estágio foram internados e acompanhados 16 animais e foram observadas 4 eutanásias.

Tabela 1 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a área da medicina veterinária.

Área da medicina veterinária	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Medicina Clínica	220	56
Medicina Preventiva	116	29
Medicina Cirúrgica	35	9
Medicina de Urgências	24	6
Total	395	100

1.2.1. Medicina Clínica

Os diferentes casos foram divididos nas principais 15 especialidades, sendo que o maior número de casos pertence à especialidade de dermatologia, com valores também elevados em gastroenterologia e urologia e nefrologia (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a especialidade.

Especialidades médicas	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Dermatologia	63	24
Gastroenterologia	49	18
Urologia e nefrologia	34	13
Ortopedia	26	10
Doenças infeciosas	19	7
Oncologia	16	6
Neonatologia	10	4
Neurologia	10	4
Oftalmologia	10	4
Endocrinologia	7	3
Reprodução, ginecologia, andrologia e obstetrícia	6	2
Cardiologia	6	2
Estomatologia	5	2
Pneumologia	3	1
Comportamento	1	0,4
Total	264	100

1.2.2 Medicina Preventiva

A medicina preventiva tem um papel cada vez mais central na medicina veterinária, tendo sido elevada a frequência das vacinações e desparasitações observadas e executadas, conforme foram registadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Frequência relativa e absoluta dos métodos de medicina preventiva aplicados**.**

Medicina profilática	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Vacinação	77	57
Desparasitação	59	43
Total	136	100

1.2.3. Medicina Cirúrgica

O tipo de cirurgia mais realizada foi a de tecidos moles, sendo que, 17 foram orquiectomias, 9 foram ovariohisterectomias, 2 foram nodulectomias em casos oncológicos e 1 cesariana. Em segundo lugar encontram-se a cirurgia da cavidade oral e em terceiro a cirurgia ortopédica (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência relativa e absoluta dos procedimentos cirúrgicos realizados.

Medicina cirúrgica	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Cirurgia dos tecidos moles	30	86
Cirurgia da cavidade oral	3	8
Cirurgia ortopédica	2	6
Total	35	100

1.2.4. Medicina de Urgências

A medicina de urgências foi a área da medicina veterinária menos explorada, contudo, conta com 24 casos, sendo os de politraumatizados (geralmente associados a atropelamentos ou lutas entre animais) os mais frequentes (Tabela 5).

Tabela 5 – Frequência relativa e absoluta dos casos acordo com o tipo de urgência.

Medicina de urgências	**Frequência absoluta *(n*)**	**Frequência relativa (%)**
Politraumatismo	10	42
Neurologia	3	13

Doenças infeciosas	3	13
Neonatologia	2	8
Pneumologia	2	8
Toxicologia	2	8
Urologia e nefrologia	2	8
Total	24	100

1.3 Exames Complementares de Diagnóstico

A tabela 6 resume os exames complementares de diagnóstico observados durante o. estágio.

Tabela 6 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de métodos de diagnóstico utilizados.

Exames complementares de diagnóstico	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Análises sanguíneas (hemograma e bioquímicas séricas)	83	43
Imagiologia	65	34
Procedimentos de colheita	25	13
Testes específicos	19	10
Total	192	100

Dentro dos exames imagiológicos, 31 destes foram ecografias, principalmente abdominais, mas também torácicas, 1 ecocardiografia e 33 radiografias.

Dos 25 procedimentos de colheita, 1 tratou-se de uma toracocentese, 6 punções aspirativas de agulha fina, 10 cistocenteses, 2 lavagens broncoalveolares, 4 colheitas de amostra de conteúdo auricular/cutâneo e 2 biópsias.

Os testes específicos pretendem a identificação de uma doença particular no animal. Foram realizados 2 testes de cromatografia de Leishmaniose, 7 testes de cromatografia de vírus da imunodeficiência e leucemia felinos, 4 testes de cromatografia de parvovirose, 3 testes de fluoresceína e 3 testes de estimulação com hormona corticotrófica.

2. Descrição do estágio curricular no Hospital do Jardim Zoológico de Lisboa

O estágio curricular teve a duração de 3 meses, de 17 de janeiro a 20 de abril de 2023, sobre a orientação do Doutor Rui Bernardino, diretor clínico do estabelecimento. O estágio permitiu à autora ter contacto com espécies animais exóticas e selvagens, aprender sobre especificidades de tratamento de cada uma e desenvolver capacidade de raciocínio heterodoxo, uma vez que a abordagem tradicional utilizada em medicina de animais de companhia não é, muitas vezes, compatível com medicina de animais selvagens.

O estágio centrou-se na componente de medicina interna de animais selvagens, com participação da autora em vários procedimentos médicos, nomeadamente no estudo da fisiologia própria da espécie - com o intuito de decidir os exames diagnósticos e tratamentos médicos para cada caso -, auxiliar na sedação e anestesia (necessária para contenção de vários dos animais), medicar animais, colheita de sangue, colocação de cateteres, realização de exames imagiológicos e treino com zarabatana e dardos para administração de fármacos à distância.

O trabalho do médico veterinário de zoo implica várias vertentes, pelo que a autora foi incluída em visitas específicas à área de nutrição e de jardinagem, em diferentes projetos, como monotorização e realização de estatísticas sobre comportamentos de cio em chitas, projeto de enriquecimento ambiental de calaus-de-casco-preto e projeto de categorização de tartarugas do Egipto para estudo genético organizado pela Associação Europeia de Zoológicos e Aquários.

Adicionalmente, o contacto com uma equipa multidisciplinar de excelência permitiu à autora evoluir para um profissional mais completo e versátil. A aprendizagem de como liderar com uma organização estabelecida, respeitar cadeias de comando e interagir com um grupo grande de tratadores ofereceu uma visão mais completa da profissão, com impacto fundamental para o futuro profissional da autora.

A casuística recolhida durante o estágio está organizada de acordo com a espécie animal e dividida nas principais áreas da medicina exploradas com adicional descrição dos exames diagnósticos realizados nos diferentes casos.

2.1. Distribuição da casuística por classe e espécie animal

Durante o estágio foi possível estudar, examinar e contactar com 119 animais. De entre estes, 88 são mamíferos (75%), 18 são aves (15%) e 12 são répteis (10%).

Na classe dos mamíferos, estudaram-se 38 espécies diferentes. As mais comuns foram os Babuínos-hamandrias e os Golfinhos-roazes, com 13 e 8 animais avaliados,

respetivamente. As restantes espécies avaliadas foram: Elefante-africano-de-savana; Girafa-de-Angola; Guaxinim e Lobo-ibérico, com 4 animais por espécie. O Coelho-bravo; Gorila-ocidental-de-terras-baixas; Leão-africano; Macaco-capuchinho-de-peito-amarelo; Sitatunga e Zebra-de-grevy, com 3 animais por espécie. A Chita; Canguru-vermelho; Gibão-de-mãos-brancas; Koala; Macaco-de-brazza; Okapi e Urso-formigueiro-gigante, com 2 animais por espécie. Apenas um animal foi examinado das espécies: Adáx; Áxis; Bisonte-americano; Bongo; Canguru-de-bennett; Chimpanzé; Elande-de-cara-preta; Lémure-de-cauda-anelada; Lémure-preto-e-branco-de-colar; Lince-euroasiático; Macaco-do-Japão; Órix-austral; Panda-vermelho; Pantera-nebulosa; Porco-espinho-africano; Porco-vietnamita; Rinoceronte-branco; Saimiri-da-Bolívia e Tigre-da-Sibéria.

Na classe das aves, foram examinadas 15 espécies. As espécies mais frequentes foram a Arara-nanica, a Ema e o Faisão-argus, tendo sido avaliados dois animais de cada espécie. Apenas um animal foi avaliado das espécies: Arara-escarlate; Arara-vermelha-de-asa-verde; Catatua-branca; Catatua-sanguínea; Ganso-chinês; Grifo; Íbis-eremita; Mutum-de-capacete; Papagaio-cinzento; Pato-de-meller; Seriema e Turaco-de-buffon.

Finalmente, foram avaliados na classe dos répteis 8 espécies. As mais frequentes foram: Hidrossauro-das-Filipinas; Tartaruga-grega; Tartaruga-do-Egipto e Tartaruga-leopardo-africano, correspondendo a 2 animais para cada uma. Ás restantes corresponde a observação de um animal por espécie: Dragão-barbudo; Iguana-rinoceronte; Pitão-reticulada e Tartaruga-de-orelhas-vermelhas.

2.2. Distribuição da casuística por área da medicina veterinária

A principal área foi a medicina clínica, seguida da medicina preventiva, cirúrgica e anestesiologia, nutrição, urgências e finalmente, alternativa. Note-se que um mesmo animal poderá encontrar-se presente em mais do que uma destas categorias (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a área da medicina veterinária.

Área da medicina veterinária	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Medicina Clínica	121	67
Medicina Preventiva	27	15
Medicina Cirúrgica e Anestesiologia	18	10
Nutrição	8	4

Medicina Alternativa	3	2
Medicina de Urgências	3	2
Total	180	100

2.2.1. Medicina Clínica

A maioria dos casos clínicos registados pertencem à área da medicina clínica, sendo que gastroenterologia foi a principal especialidade praticada, seguida da dermatologia. Apesar de em menor quantidade, mencionam-se alguns casos de ortopedia e pneumologia (Tabela 8).

Tabela 8– Frequência relativa e absoluta dos casos clínicos de acordo com a especialidade.

Especialidades médicas	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Gastroenterologia	24	20
Dermatologia	17	14
Ortopedia	16	12
Pneumologia	11	9
Doenças infeciosas	9	7
Traumatismo	9	7
Comportamento	8	7
Oftalmologia	7	6
Estomatologia	5	4
Reprodução, ginecologia, androlologia e obstetrícia	4	3
Oncologia	3	2
Doenças metabólicas	2	2
Neurologia	2	2
Urologia e nefrologia	2	2
Cardiologia	1	1
Neonatologia	1	1
Total	121	100

2.2.2. Medicina Preventiva

Em medicina dos animais selvagens, a vacinação não é uma prática recorrente, ao contrário da desparasitação que é de uso comum no estabelecimento em que se realizou o

estágio. Foi, ainda, acompanhado um animal em quarentena, devido à sua entrada em Portugal (Tabela 9).

Tabela 9 – Frequência relativa e absoluta dos métodos de medicina preventiva aplicados.

Medicina preventiva	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Desparasitação	26	93
Quarentena	1	3
Total	27	100

2.2.3. Medicina Cirúrgica e Anestesiologia

A medicina cirúrgica encontra-se dividida segundo as principais intervenções. Em 11 casos (55%) foi utilizada anestesia como contenção química para manipulação dos animais, sem intervenção cirúrgica. As cirurgias propriamente ditas correspondem a situações onde foi aplicada anestesia precedente a uma intervenção cirurgica, representando 9 intervenções (45%) (Tabela 10). No total foram realizadas 18 intervenções anestésico-cirúrgicas.

Foram consideradas microcirurgias, por exemplo, a aplicação de implantes subcutâneos contracetivos em chimpanzés. As cirurgias ortopédicas referem-se à estabilização cirúrgica de fraturas e amputações. As cirurgias da cavidade oral referem-se, por exemplo, à extração de dentes.

Tabela 10 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de cirurgias realizadas.

Cirurgia propriamente dita	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Microcirurgia	4	45
Cirurgia ortopédica	3	33
Cirurgia da cavidade oral	2	22
Total	9	100

2.2.4. Medicina Alternativa

No total foram utilizados dois métodos de medicina alternativa. Em dois animais foi utilizada ozonoterapia (67%), através de ionização de óleo de fígado de bacalhau, para tratamento de um babuíno-hamadrias com infeção por *Helicobacter pylori* e num Golfinho-roaz foi utilizada laserterapia como tratamento de regressão e inflamação gengival (33%).

2.3. Exames Complementares de Diagnóstico

A tabela 11 resume os exames complementares de diagnóstico observados durante o estágio no Jardim Zoológico de Lisboa.

Tabela 11 – Frequência relativa e absoluta dos diferentes tipos de métodos de diagnóstico utilizados.

Exames complementares de diagnóstico	**Frequência absoluta (*n*)**	**Frequência relativa (%)**
Procedimentos de colheita	60	48
Imagiologia	36	29
Análises sanguíneas (hemograma e bioquímicas séricas)	17	13
Testes específicos	13	10
Total	126	100

Dentro dos exames imagiológicos, 18 destes foram radiografias, 14 foram ecografias, principalmente abdominais, mas também torácicas, 3 endoscopias gástricas e uma ecocardiografia.

Dos 60 procedimentos de colheita, os mais frequentes foram a colheita de fezes, punções aspirativas de agulha fina, colheitas de suco gástrico e de pêlo. Com menor frequência, foram realizadas colheitas de conteúdo opercular expirado, colheita de liquido peritoneal, cistocentese, raspagens e zaragatoas cutâneas, zaragatoa respiratória, lavagem bronco-alveolar, biópsias do trato gastrointestinal através de endoscopia e toracocentese.

Os testes específicos pretendem a identificação de uma doença particular no animal. Foram realizadas 6 citologias cutâneas, 4 necrópsias, 2 testes da fita-cola e 1 teste de tuberculinização intradérmica. Foram observadas 4 eutanásias.

3. Apresentação do póster científico

A presente dissertação foi apresentada sob a forma de um póster científico, dia 3 de novembro de 2023 no simpósio intitulado “The 2nd Egas Moniz One Health Symposium” realizado pela Egas Moniz Shool of Health and Science (Figura A1).

II – Estudo histológico e imunohistoqímico da expressão de Ki-67 em carcinoma das células escamosas em gatos

1. Introdução teórica

1.1. A etiologia do cancro

O termo “cancro” refere-se, na sua essência, a uma doença genética (Vonglstein & Kinzler, 2004), uma vez que tem origem na acumulação de anomalias genéticas (Modiano, 2012). Esta acumulação promove a seleção clonal das células com comportamento progressivamente mais agressivo, que eventualmente irá resultar no desenvolvimento de um tumor (Faeron, 1997). As alterações celulares que permitem tal desenvolvimento derivam de relações epigenéticas, influenciadas por características hereditárias e agentes ambientais. Encontra-se descrito que anomalias genéticas especificas estão associadas a tipos particulares de cancro (Modiano, 2012). Estas alterações podem ser nomeadas de mutações que, por sua vez, são definidas como qualquer alteração na sequência genómica de um organismo (Vonglstein & Kinzler, 2004).

1.1.1 Influência genética no risco de cancro

Todas as doenças cancerígenas apresentam em comum a presença de proliferação e crescimento celular descontrolado. Apesar destas características estarem associadas a alterações genéticas, nem sempre há um fator hereditário presente (Modiano, 2012). O desenvolvimento tumoral deve-se à acumulação de mutações que eliminam a inibição fisiológica da proliferação e da manutenção da integridade genética das células somáticas. Para que ocorra ativação da tumorgénese, é necessária a mutação de pelo menos um de três tipos de genes: oncogenes, genes supressores de tumor e genes estabilizadores (Vonglstein & Kinzler, 2004). As células de mamíferos apresentam múltiplos mecanismos de defesa que os protegem contra efeitos potencialmente fatais das mutações genéticas, sendo que apenas quando um conjunto de genes apresenta alterações se inicia o desenvolvimento neoplásico (Vonglstein & Kinzler, 2004). Estas alterações são influenciadas por fatores ambientais, pelo que é mais correto pensar nos genes mutados como contribuidores, e não causadores de cancro (Vonglstein & Kinzler, 2004), sendo, contudo, igualmente incorreto afirmar que o ambiente é o único fator responsável pelo aparecimento de tumores (Modiano, 2012).

Oncogenes tratam-se de formas mutadas de genes normais presentes no genoma, denominados de proto-oncogenes (Mylonas & O’Loghlen, 2022). Em circunstâncias normais, estes genes regulariam funções fisiologicamente favoráveis para a célula (por exemplo, regular positivamente a proliferação celular e apoptose), mas quando mutados, devido à sua

consequente sobre expressão ou amplificação, estes apresentam potencial para promover o desenvolvimento de cancro. Genes supressores de tumor codificam proteínas com funções de regulação de vias que contribuem para a prevenção de desenvolvimento tumoral. Logo, a sua perda de função leva à perda destas propriedades protetoras, podendo culminar no desenvolvimento de cancro (Mylonas & O'Loghlen, 2022). Os genes de estabilização são responsáveis pela manutenção da estabilidade genómica. Esta é essencial para a proteção da integridade celular e, consequentemente, a prevenção de erros replicativos no ácido desoxirribonucleico (ADN) e defesa do mesmo contra insultos exógenos com potencial carcinogénico e fatores genotóxicos endógenos (Yao & Dai, 2014).

A ativação dos oncogenes resulta de translocações cromossomais e poderá ocorrer mesmo quando não estão presentes os componentes e condições necessários para ativação do mesmo gene quando não mutado. Uma mutação num único alelo de um oncogene é, geralmente, suficiente para conferir uma vantagem de crescimento seletivo à célula (Vonglstein & Kinzler, 2004).

Genes supressores de tumores são alterados de forma oposta, pois as mutações reduzem a atividade do produto do gene. Contudo, neste caso são necessárias mutações em ambos os alelos materno e paterno para conferir vantagem seletiva à célula afetada (Vonglstein & Kinzler, 2004).

Pode dizer-se que, enquanto nos proto-oncogenes as mutações são facultadoras de função, os genes supressores de tumores são inativados através de mutações (Santarosa & Ashworth, 2004).

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor operam de modo semelhante a nível fisiológico. Estas promovem o aumento de células tumorais através da estimulação do nascimento de novas células ou da inibição da morte celular ou do bloqueio do ciclo celular (Vonglstein & Kinzler, 2004).

A terceira classe de genes tumorais são os genes que conferem estabilidade. Estes são responsáveis por reparar qualquer erro presente durante a normal replicação de ADN ou induzido pela exposição a agentes mutagénicos. Estes genes são essenciais, porque mantém as alterações genéticas em números mínimos e, como tal, quando são inativados, mutações noutros genes tornam-se mais frequentes (Vonglstein & Kinzler, 2004). Todos os genes do organismo podem ser alterados com o subsequente aumento da taxa de mutações, mas apenas mutações em proto-oncogenes ou genes supressores de tumor afetam o crescimento celular e conferem vantagens de crescimento seletivo à célula mutada. Tal como nos genes supressores de tumor, ambos os alelos necessitam, geralmente, de estar inativados para que alterações fenótipicas se manifestem (Vonglstein & Kinzler, 2004).

Um igualmente importante, mas menos reconhecido mecanismo de mutagénese é a taxa de erro inerente à enzima que controla a replicação de ADN, denominada de ADN polimerase. Sempre que uma célula se divide, a célula filha terá, provavelmente, algumas centenas de mutações no seu ADN. A maioria das mutações, sejam causadas por fatores extrínsecos ou intrínsecos, são silenciosas, isto é, não alteram a capacidade da célula de funcionar. Contudo, outras poderão inibir genes supressores de tumores ou ativar proto-oncogenes (Modiano, 2012).

A maioria dos neoplasmas tem origem numa única célula e a progressão tumoral resulta da aquisição de variabilidade genética no clone original, permitindo uma seleção sequencial das sublinhas clonais mais agressivas. Populações celulares tumorais são mais geneticamente instáveis do que populações celulares normais (Nowell, 1976).

A expansão clonal de células com lesões genéticas num gene supressor de tumor ou oncogene aumenta a probabilidade de progressão tumoral, porque gera um conjunto considerável de células onde alterações genéticas adicionais se podem manifestar. Quando uma lesão genética tiver abrangido uma população celular, deixa de existir competição entre alelos e a seleção natural deixa de ter influência, não havendo assim alterações da frequência dessa mesma lesão na população (Maley et al, 2004).

Mutações nestas três classes de genes podem ocorrer na linhagem germinativa o que dá origem a uma predisposição genética ou podem ocorrer em células somáticas o que resulta em cancros esporádicos (Vonglstein & Kinzler, 2004).

1.1.2 Influência genética em cancros esporádicos

Em síndromes de cancro hereditário, a predisposição para desenvolvimento de um tumor advém da presença de uma mutação heterozigota num alelo de um gene supressor de tumor em células da linha germinativa. Como tal, estes tendem a desenvolver-se mais cedo do que cancros esporádicos. Estes últimos necessitam de consideravelmente mais tempo para se desenvolver, pois requerem a ocorrência de dois eventos mutacionais, isto é, a inativação de ambos os alelos de um mesmo gene (Santarosa & Ashworth, 2004).

Ao contrário de doenças causadas por defeitos num único gene, o cancro é uma doença complexa e multigenética. Um evento genético dota uma célula somática com potencial ilimitado de replicação, crescimento ou vantagens de sobrevivência em comparação com outras células do seu microambiente. Sozinho, este evento é insuficiente para gerar um tumor, pois a célula permanece restringida por fatores ambientais. Um segundo evento adicionará às habilidades da célula a capacidade de superar as suas vizinhas, potencialmente levando à sua expansão e consequente evolução num tumor reconhecível. Um terceiro

evento, reforça o potencial maligno da célula (invasão, destruição tecidual e metastisação), levando a uma doença clínica. Estes “eventos” não se referem a mutações únicas, mas uma série de mutações que ocorrem em concerto para alterar o fenótipo morfológico e funcional da célula (Modiano, 2012).

1.1.3 As características do cancro

Hanahan & Weinberg, (2000) clarificaram conceitos importantes sobre o cancro e o seu desenvolvimento: nenhum gene único é universalmente responsável pela transformação cancerígena; cinco ou seis mutações são o número mínimo necessário para originar o fenótipo cancerígeno (observação confirmada experimentalmente); tumores atuam como tecidos; cada passo é regulado por múltiplos mecanismos bioquímicos que interagem entre si, como tal, mutações de diferentes genes ao longo de uma cascata mecanística podem resultar em fenótipos equivalentes, e inversamente, mutações do mesmo gene podem resultar em diferentes cancros com biologias distintas; e as interações entre o tumor e o seu microambiente são as principais promotoras do comportamento cancerígeno.

Durante o processo de evolução progressiva de células normais para estados neoplásicos, elas adquirem uma sucessão de características. Estas são distintas, mas complementares e são elas que permitem o crescimento tumoral e a disseminação metastática (Hanahan & Weiberg, 2011)

No trabalho de Hanahan & Weiberg, realizado em 2000, compilaram-se as seis principais características para que ocorra transformação celular e desenvolvimento tumoral, sendo elas, a autossuficiência tumoral em sinalizadores de crescimento; dessensibilização à sinalização por inibidores de crescimento; capacidade de evitar apoptose; potencial replicativo ilimitado; angiogénese contínua e capacidade de invadir tecidos e metastizar. Em 2011, os mesmos autores adicionaram novas “características favoráveis” como a instabilidade no genoma e presença de inflamação promotora do desenvolvimento tumoral (Hanahan & Weiberg, 2011) e ainda, “características emergentes” passaram a acompanhar as outras seis já descritas devido à sua importância equivalente, sendo elas a reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imunitário (Hanahan, 2022) (Figura A2).

1.1.3.1 Autossuficiência em sinalização de crescimento

O evento mais importante na transformação neoplásica é a capacidade das células de proliferar de forma crónica (Hanahan & Weiberg, 2011). Em tecidos normais existe um controlo da produção e libertação de sinais promotores de crescimento, mantendo a homeostase do

número de células e a normal arquitetura e função dos tecidos. Geralmente esta sinalização tem influência em propriedades biológicas da célula como a sobrevivência celular e o metabolismo energético (Hanahan & Weiberg, 2011).

Em condições normais as células comunicam entre si através de sensibilidade a sinalizadores e gradientes. A migração, o metabolismo e a proliferação são reguladas através da ação autócrina e parácrina de citoquinas. Estas podem, ainda, viajar sistemicamente e atuar de forma endócrina (Modiano, 2012). Geralmente, as citoquinas atuam ligando-se a recetores transmembranares, que em resposta iniciam cascatas de sinalização que permitem à célula adaptar o seu comportamento de acordo com os sinais ambientais. O sistema pode ser inibido quando a concentração de citoquinas diminui além do limiar que lhes permite ligarem-se de forma estável aos recetores; quando os recetores deixam de ser expressos pelas células; ou quando as moléculas sinalizadoras deixam de ser produzidas ou são inativadas. Contudo, mutações, mesmo que em apenas numa das moléculas envolvidas na regulação destes mecanismos, podem levar a uma presença contínua de sinalizadores de crescimento, sem que tenham de ser ativados pela presença de citoquinas (Hanahan & Weiberg, 2000; Hanahan & Weiberg, 2011; Modiano, 2012).

Os genes que codificam as proteínas promotoras de crescimento são os proto-oncogenes e as versões mutadas que permitem às células ganharem autossuficiência são, como já mencionado, os oncogenes. É importante referir que nem todos os genes promotores de crescimento têm capacidade de se tornam oncogenes e que o resultado da ativação oncogénica é geralmente a senescência ou apoptose celular, a não ser que ocorram eventos adicionais que promovam uma transformação estável e consequente sobrevivência celular (Hanahan & Weiberg, 2000; Hanahan & Weiberg, 2011; Modiano, 2012).

1.1.3.2 Insensibilidade a fatores inibidores de crescimento

Para além da capacidade de induzir e manter a atividade dos sinalizadores estimulantes de crescimento, as células neoplásicas necessitam simultaneamente de evitar programas que regulam a proliferação celular. Muitos destes programas dependem dos genes supressores de tumor, sendo responsáveis por regular a atividade dos proto-oncogenes promotores de crescimento (Hanahan, 2011; Modiano, Ritt, Wojcieszyn & Smith, 1999). Estes atuam em conjunto na maioria dos mecanismos bioquímicos do organismo e a perda de função de um ou mais genes supressores de tumor, ou seja, da capacidade de inibir os proto-oncogenes, ocorre virtualmente em todos os cancros (Modiano, 2012). Para manter a homeostasia, as células também necessitam de integrar sinais inibidores de crescimento do ambiente. A quiescência, isto é, a manutenção temporária do estado não proliferativo é

conseguida em células não hematopoéticas através de inibição por contacto (Modiano *et al.,* 1999). Células hematopoiéticas, por outro lado, utilizam contactos célula-célula para regular o momento e intensidade das suas funções hematopoiéticas, imunitárias e inflamatórias (Modiano, Johnson & Bellgrau, 2008). A disfunção de todos estes mecanismos leva a uma incapacidade da célula de evitar a sobrecarga de fatores de crescimento.

1.1.3.3 Evasão à morte celular

Morte celular programada, ou apoptose, é o fim intrínseco de todas as células de organismos multicelulares (Hammerman, Fox & Thompson, 2004). Esta é vista como central em vários processos como o *turnover* celular, correto desenvolvimento e função do sistema imunitário, desenvolvimento embrionário e morte celular quimicamente induzida. Apoptose imprópria, elevada ou reduzida, está presente em várias doenças, incluindo diversos tipos de cancro (Elmore, 2007). A capacidade de evasão à morte celular programada está associada à perda de genes supressores de tumores proapoptóticos como o p53, um dos genes mais comumente mutados em cenários neoplásicos ou através da aquisição da função de genes antiapoptóticos (apesar de tumores com origem em mutações nestes últimos raramente serem identificados em animais de companhia) (Hanahan & Weiberg, 2000; Hanahan & Weiberg, 2011; Modiano, 2012).

Na ausência destes mecanismos fisiológicos de morte celular, o corpo irá reagir às disrupções anatómicas e fisiológicas causadas, através da ativação de mecanismos de inflamação (Hanahan & Weiberg, 2000; Hanahan & Weiberg, 2011; Modiano; 2012).

1.1.3.4 Potencial replicativo ilimitado

Imortalização é outra característica essencial do cancro. Esta característica contrasta com o comportamento fisiológico da maioria das linhagens celulares, que, por norma, apresentam um número limitado de ciclos de divisão e crescimento sucessivos. Este limite está associado a duas barreiras distintas da proliferação: a senescência e estados de crise, que envolvem morte celular (Hanahan & Weiberg, 2011). Senescência (cessar permanente do ciclo celular) é uma característica de degenerescência celular e tem um papel em doenças associadas ao envelhecimento do organismo, pois impede o perpetuamento genómico de células mutadas ou danificadas (McHugh & Gil, 2018; Park *et al.*, 2023). Esta corresponde a um estado celular caracterizado por um bloqueio estável no ciclo celular, lesões a nível macromolecular, desregulação do metabolismo e alterações da morfologia celular, podendo

ser ativada por uma variedade de fatores como a diminuição dos telómeros, ativação oncogénica e presença de espécies reativas de oxigénio (ROS) (Mylonas & O'Loghlen, 2022).

A senescência celular e a sua correlação com mecanismos de carcinogénese foram estudadas experimentalmente. Quando em cultura, após cerca de 50-70 divisões celulares, as células alcançam um primeiro estado de senescência, entrando depois na fase de crise em que a maioria da população celular morre. Em situações raras, de uma população em crise emergem células com potencial replicativo ilimitado. Essa transição foi nomeada como imortalização, uma característica que linhagens celulares possuem quando apresentam a capacidade de se proliferar em cultura sem evidência de senescência ou de crise. (Hanahan & Weiberg, 2011; Zvereva, Shcherbakova & Dontsova, 2010)

Células com capacidade de se replicar necessitam de manter a integridade dos telómeros (presentes nas extremidades de cromossomas). Estas sequências de ADN replicativo (moléculas de ADN formadas através da replicação semiconservativa da molécula original) protegem os cromossomas de possível destruição. Tumores sólidos adquirem imortalidade predominantemente pela ativação do sistema da enzima telomerase (Aze & Maiorano, 2018; Ohyashiki, Sashida, Tauchi & Ohyashiki, 2002). Esta enzima é responsável pela manutenção do comprimento dos telómeros através da adição de sequências repetitivas ricas em guanina (Zvereva *et al.,* 2010). Em células hematopoiéticas, a atividade da telomerase aparenta ser mais duradoura do que em células somáticas, podendo tal facilitar a imortalização em cancros como linfoma e leucemia (Ohyashiki *et al.*, 2010). A eventual imortalização de variantes celulares raras que leva à formação de tumores tem sido atribuída à habilidade das células de manter o ADN presente nos telómeros com dimensões propícias à evasão da senescência ou da apoptose (Hanahan & Weiberg, 2011).

1.1.3.5 Angiogénese

Tal como os tecidos normais, os tumores necessitam de nutrientes e oxigénio para sobreviver, bem como de eliminar metabolitos e dióxido de carbono. Tal é feito através de vasculatura gerada através de angiogénese (Hanahan & Weiberg, 2011)

Após a formação da vasculatura, durante a gestação, a maioria dos vasos torna-se quiescente. Na vida adulta, em cenários fisiológicos como na regeneração de feridas e no ciclo reprodutivo em fêmeas, a angiogénese é ativada, mas apenas de forma transiente. Pelo contrário, durante a progressão tumoral, esta ativação está quase sempre presente e permanece ativa, originando continuamente novos vasos sanguíneos que permitem a manutenção e expansão de neoplasias em crescimento (Hanahan & Folkman, 1996).

A vasculatura tumoral consiste na formação precoce de capilares originando vasos deformados e aumentados, ramos vasculares excessivos e convolutos, fluxo sanguíneo errático, microhemorragias e níveis anormais de proliferação e apoptose de células endoteliais (Nagy *et a.l*, 2010 e Baluk *et al*., 2005 citado por Hanahan & Weiberg, 2011).

A maioria da informação sugere que terapias com antiangiogénicos beneficiam pacientes oncológicos. Estes propiciam a normalização vascular, revertendo disfunções hemodinâmicas e anatómicas criadas pelo microambiente tumoral, eliminando algumas das vantagens intrínsecas que este sistema oferece às células neoplásicas, além de permitir melhor penetração de fármacos (Modiano, 2012).

1.1.3.6 Invasão e metástase

Fidler (2003) sugeriu que o processo de invasão tumoral e metastização à distância decorre de acordo com um longo conjunto de passos sequenciais e interligados. Uma falha ou insuficiência em qualquer um destes pode interromper o processo. Para que seja bem-sucedido é necessária a aquisição de recursos que permitem a invasão local do tecido por células neoplásicas, para que seguidamente deixem o local onde se encontra o tumor primário por intravasamento em vasos sanguíneos e linfáticos próximos e se disseminem pelo sistema vascular e linfático. Uma vez na circulação, ocorre extravasamento dos vasos para o parênquima e estroma de tecidos distantes favoráveis, com posterior formação de pequenos nódulos de células tumorais denominados de micrometástases e culminando com o crescimento destas lesões em tumores macroscópicos, sendo este último passo denominado de “colonização” (Findler, 2003; Hanahan & Weiberg, 2011). Células da medula óssea têm propriedades intrínsecas que lhes permitem viajar através do corpo, e como tal, estas são inerentemente metastáticas (Modiano, 2012).

1.1.4 Características “emergentes” e “favoráveis” das células tumorais

Isoladamente, as características centrais das células tumorais falham em explicar a complexidade da patogénese do cancro. Deste modo, surgem as “características emergentes e favoráveis”. Estas influenciam nos mecanismos celulares e moleculares através dos quais as características centrais são adquiridas (Hanahan, 2022).

1.1.4.1 Instabilidade genómica

A análise genómica tumoral, mesmo em estádios iniciais, demonstra a presença de aneuploidia (número anormal de cromossomas), bem como alterações caóticas indicativas de

múltiplas anomalias numéricas e estruturais do ADN (Boveri, 2008 citado por Modiano, 2012). A aneuploidia é especialmente evidente em tumores sólidos (Modiano, 2012; Pihan, 2003). As funções dos genes estabilizadores consistem na deteção de lesões no ADN e ativação de mecanismo de reparação, na reparação direta do ADN e na inativação de moléculas mutagénicas antes de estas lesionarem o ADN. A perda destas funções irá resultar em inúmeras lesões e instabilidade do genoma (Negrini et al, 2010, Ciccia and Elledge, 2010, Jackson and Market, 2009, Kastan, 2008, Harper and Elledge, 2007, Friedberg et al, 2006 citado Hanahan & Weiberg, 2011).

Outra fonte de instabilidade no cariótipo trata-se da perda de ADN dos telómeros associada a amplificação e deleção de segmentos cromossomais (Artandi and Depinho, 2010 citado por Hanahan & Weiberg, 2011).

1.1.4.2 Inflamação promotora de tumor

Em 1986, ao estudar as interações entre o tecido tumoral e o estroma associado ao tumor, Dvorak relatou a recorrente observação que tumores são frequentemente infiltrados por células inflamatórias do sistema inato (granulócitos, histócitos e macrófagos) e do adaptativo (linfócitos), referindo-se aos tumores como “feridas que nunca cicatrizam”.

Efetivamente, a inflamação contribui para o crescimento e sobrevivência tumoral através do fornecimento de diferentes fatores que mantêm a sua proliferação. Em simultâneo, limitam a morte celular e estimulam a ação de fatores proangiogénicos e enzimas modificadoras da matriz extracelular que facilitam a angiogénese, invasão e metástase (DeNardo *et al*, 2010; Grivennikov *et al*, 2010, Qian & Pollard, 2010; Karnoub & Weinberg, 2006-2007 citados por Hanaha & Weiberg, 2011). Adicionalmente, células inflamatórias libertam ROS que são ativamente mutagénicas, acelerando a evolução genética das células neoplásicas para estados de maior malignidade (Grivennikov, Greten & Karin, 2010).

A inflamação é evidente nos estádios iniciais da progressão neoplásica e foi demonstrada experimentalmente a sua capacidade de transformar neoplasias incipientes em cancros completamente estabelecidos (Qian & Pollard, 2010, de Visser et al, 2006 citado por Hanahan & Weiberg, 2011).

1.1.4.3 Reprogramação do metabolismo energético

Tal como todas as células, também as células neoplásicas necessitam de produzir energia de modo a manter o seu ritmo de proliferação acelerado. Perante esta questão, Otto Warburg observou, em vários dos seus trabalhos ao longo dos anos, que as células

neoplásicas não utilizam preferencialmente vias oxidativas (aeróbias) para produzir energia, mas sim vias glicolíticas (anaeróbias), mesmo quando expostas a concentrações normais ou elevadas de oxigénio (Warburg 1930,1956, 1956 citado por Hanahan & Weiberg, 2011; Mondiano, 2012). Esta particularidade metabólica, que se designa de efeito *Warburg*, aparenta ser induzido por oncogenes ativados e/ou pela perda de genes supressores de tumor (Modiano, 2012; Otto, 2016). A dependência destas células da glicólise é mais acentuada em condições de hipóxia (Modiano, 2012).

Em alguns tumores, de modo a criar um ambiente energético eficiente, ainda que homeostaticamente perturbado, as células neoplásicas dividem-se em células secretoras de lactato (efeito *Warburg*) e células consumidoras de lactato (Kennedy and Dewhisrt, 2010, Feron, 2009, Semenza, 2008 citado por Hanahan & Weiberg, 2011; Modiano, 2012), sendo que estas duas populações celulares trabalham de forma simbiótica (Hanahan & Weiberg, 2011). Esta reprogramação dota as células neoplásicas de mecanismos energéticos operativos mesmo em condições desfavoráveis, que outrora culminariam com a morte celular.

1.1.4.4 Evasão da destruição pelo sistema imunitário

Em 1950, Burnet & Thomas propuseram a hipótese de que o sistema imunitário teria a capacidade de reconhecer e destruir tumores incipientes, a qual denominaram de hipótese da imunovigilância (Dunn, Bruce, Ikeda, Old & Schreiber, 2002). Logicamente, para que se desenvolvam tumores sólidos é necessário que estes tenham conseguido evitar a sua deteção por diferentes componentes do sistema imunitário e limitar a morte imunológica (Hanahan & Weiberg, 2011). Esta teoria foi aperfeiçoada, uma vez que o termo "imunovigilância" se referia à proteção do organismo apenas contra os primeiros estádios da transformação celular neoplásica. Criou-se assim o termo "imunoedição", que engloba as ações protetoras, mas também modeladoras do cancro por parte do sistema imunitário (Dunn *et al.,* 2002). Este novo conceito explica como o sistema imunitário modela o desenvolvimento tumoral através da destruição de células tumorais fortemente antigénicas, o que fornece uma vantagem de sobrevivência a células fracamente antigénicas (Modiano, 2012).

A epidemiologia clinica demonstra cada vez mais a existência de respostas imunes anti-tumorais em diferentes formas de tumores humanos (Bindae et al, 2010, Ferrone and Dranoff, 2010, Nelson, 2008 citados por Hanahan & Weiberg, 2011). Por exemplo, doentes com cancro do cólon e dos ovários fortemente infiltrados de linfócitos T citotóxicos e células *natural killer* apresentam melhor prognóstico em contraste com tumores que não apresentam a mesma abundancia destas células (Pagès *et al*, 2010, Nelson, 2008 citados por Hanahan &

Weiberg, 2011). É sugerido que o mesmo poderá ocorrer noutros cancros, mas tal ainda está a ser investigado.

1.1.5 Microambiente

Tumores são mais do que massas insulares de células neoplásicas em proliferação. São, por outro lado, tecidos complexos compostos por múltiplos tipos de células diferentes que interagem entre si (Hanahan & Weiberg, 2011). O microambiente tumoral, definido como o ambiente composto por populações interativas e heterogéneas de células neoplásicas e de células germinativas neoplásicas, em conjunto com múltiplos tipos de células estromais, tem também um papel integral para a tumorigénese e progressão da malignidade (Hanahan, 2022). Deste modo, para se entender a biologia dos tumores não se pode ter em atenção apenas características das células neoplásicas, mas também das contribuições do microambiente. Por exemplo, as células neoplásicas enviam sinais de modo a estimular as células que constituem o estroma associado ao tumor, que por sua vez retribuem através do suprimento das células neoplásicas com vários fatores de crescimento, proporcionando-lhes mecanismos de proliferação contínua, uma das características centras do cancro (Cheng *et al*., 2008; Bhowmick *et al*., 2004, ambos citados por Hanahan& Weiberg, 2011) (Figura A3).

1.2 A pele

A pele é o maior órgão do corpo, sendo uma interface entre o ambiente interno e externo. Como tal, esta atua como uma barreira dinâmica, física, mecânica e defensiva contra insultos exógenos (Coleman & Tsongalis, 2001 citados por Khan *et al*, 2021). Este órgão é responsável por coordenar a perceção sensorial e mediar respostas termorreguladoras e imunitárias (Dawes *et al*, 2016). A pele é composta por duas principais camadas - a epiderme e a derme. A epiderme é formada maioritariamente por queratinócitos, mas contém também melanócitos, células de *Merkel* e de *Langerhans*. Esta camada está dividida em cinco estratos dispostos transversalmente (córneo – mais externo, lúcido, granuloso, espinhoso e germinativo – mais interno) e atravessados por complexos pilossebáceos e glândulas sudoríparas. A derme está dividida numa camada papilar (mais externa) e outra reticular (mais interna). É no interior desta última camada que se encontra o suprimento neurovascular. O tecido subcutâneo interior à pele contem a fáscia superficial e tecido adiposo subcutâneo (Losquadro, 2017)

1.2.1 Tumores com origem na pele

A maioria dos cancros cutâneos iniciam-se na epiderme e diferenciam-se de acordo com o tipo de célula da qual originam (Khan *et al*, 2021). No geral, estes tumores são divididos em duas categorias: melanomas que consistem em tumores com origem numa disfunção dos melanócitos; e cancros não-melanoma, com origem noutras células da epiderme (Esteva *et al*, 2017). Por sua vez, estes últimos consistem em vários tipos de cancro diferentes, dependendo da célula da epiderme afetada, sendo os principais subtipos o carcinoma das células basais e o carcinoma das células escamosas (Green & Olsen, 2017).

1.2.2 Incidência de cancro da pele em animais de companhia

De momento, estudos realizados em todo o mundo demonstram que o cancro é a causa de morte em 15-30% dos cães e 26% dos gatos, sendo esta a doença fatal mais comum em animais de companhia (Bonnett, Egenvall, Olson & Hedhammar, 1997; Eichelberg & Seine, 1996; Proschowsky, Rugbjerg & Ersbøll, 2003 e Walter & Schwegler, 1992 citados por Brønden, Flagstad & Kristensen, 2007). Contudo há variações destes números de acordo com o tempo de observação e região geográfica considerados (dados recolhidos na Suécia, Alemanha e Dinamarca) (Brønden, Flagstad & Kristensen, 2007).

Pinello *et al*. (2022) realizaram um estudo de 16 272 amostras de casos oncológicos (3 266 gatos e 13 006 cães) em Portugal, com vista a analisar a malignidade de neoplasmas em animais de companhia. Neste identificou-se que os felinos apresentam quatro vezes mais probabilidade de desenvolver um tumor maligno do que os cães. Estas proporções de malignidade apresentam-se mais elevadas em fêmeas em ambas as espécies, contudo tal aparenta ser estatisticamente irrelevante em gatas. Tanto em cães como em gatos, a idade média aquando do desenvolvimento de uma neoplasia maligna foi estatisticamente mais elevada do que para os tumores benignos, ou seja, tumores malignos apresentam uma predisposição estatística para se desenvolver em animais mais velhos. O estudo também concluiu que a topografia do tumor é o fator que mais contribui para a variação entre os desfechos de malignidade, sendo que a raça contribui para o grau de malignidade tanto em cães (principalmente em Boxer e Pitbulls) como em gatos e a contribuição da localização geográfica dos animais é baixa em ambas as espécies.

Salienta-se que em ambas as espécies, as neoplasias cutâneas foram as mais frequentes (Pinello *et al.*, 2022). Na literatura, a incidência de tumores dos tecidos cutâneo e subcutâneo em pequenos animais é difícil de determinar. Contudo, dados recolhidos na Coreia do Sul, Estados Unidos da América e Canadá afirmam que os tumores cutâneos representam 25,5-43% de todos os tumores em animais de companhia (em gatos

representam 30%), sendo que desse valor 20 a 40% são malignos (Carpenter, Andrews & Holzworth, 1987; Dorn, Taylor, Schneider, Hibbard & Klauber, 1968; MacVean, Monlux, Anderson, Sillberg & Roszel, 1978; Miller *et al*., 1991; Pakhrin *et al*., 2007 e Priestar, 1973; citados por Hauck, 2012). Estudo mais antigos realizados nos Estados Unidos da América, reportaram valores semelhantes para a incidência de tumores com origem na pele em animais de companhia, mais especificamente 21% (Brodey, 1970 citado por Hauck, 2012) e 19,3% (Carpenter *et al.,* 1987 citado por Hauck, 2012). Já o estudo de Pinello *et al*. (2022), realizado em Portugal, identificou uma maior frequência de tumores da pele: 49,5% em cães e 39,6% em gatos, sendo que o risco de malignidade é superior nos gatos (62,9%).

Tanto Miller *et al.* (1991) como Carpenter, Andrews & Holzworth (1987) afirmam que a percentagem de tumores malignos cutâneos é bastante superior em felinos, chegando a 69,7% e 82% nos respetivos estudos americanos (citados por Hauck, 2012), se forem excluídos os tumores das células basais que são frequentemente benignos com reduzida capacidade de metástase. Nesta espécie, os principais tumores da pele e tecido subcutâneo são os carcinomas das células basais (CCB), mastocitomas, carcinomas das células escamosas (CCE) e fibrossarcomas, constituindo em conjunto aproximadamente 70% de todos os tumores cutâneos felinos (Hauck, 2012; Miller *et al*., 1991).

1.2.3 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de cancro da pele

Diversos fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de cancro. Khan *et al.* (2021) categoriza-os como biológicos ou não-modificáveis e não-biológicos ou modificáveis. Os fatores biológicos referem-se a fatores que são intrínsecos ao animal e como tal, não são modificáveis. Estes atuam, na sua maioria, através da alteração da síntese proteica que, consequentemente, afeta a proliferação das células cutâneas (Khan *et al*., 2021; Wu *et al*., 2016). Dentro dos fatores biológicos encontram-se a história familiar, a cor da pelagem, imunodepressão e algumas doenças virais (Khan *et al*., 2021). Os fatores não biológicos são referentes a fatores de stress ambiental a que a pele, como órgão mais externo e de defesa, está frequentemente exposta levando a alterações em vias e mecanismos moleculares envolvidos no processo de envelhecimento da pele (Flies *et al*., 2019; Parrado *et al*., 2019). Destes fatores fazem parte a radiação, elevadas altitudes e exposição solar prolongada (Khan *et al.,* 2021).

Apesar de vários destes fatores influenciarem o desenvolvimento de uma neoplasia, o principal fator associado à progressão de cancros da pele é a exposição excessiva à radiação ultravioleta (Schmitt *et al*., 2018). Esta provoca a ativação de uma cascata de mecanismos moleculares, incluindo a ativação das vias do gene supressor de tumor p53, aumento dos

danos do ADN e mutações genéticas, stress oxidativo, respostas inflamatórias, imunossupressão, indução de mecanismos de apoptose com remodelações fisiológicas da célula e bloqueio do ciclo celular (Downs *et al*., 2020).

Os danos causados pela radiação, nomeadamente a radiação ultravioleta (UV), dependem do seu subtipo. A radiação ultravioleta A (UVA) produz ROS, com capacidade de interação com proteínas e lípidos, que leva à formação de intermediários destas moléculas que, ao se combinarem com o ADN, culminam na sua fragmentação (Didona, Paolino, Bottoni & Cantisani, 2018). A radiação ultravioleta B (UVB) é a radiação violeta mais cancerígena, pois induz alterações estruturais diretamente tanto no ADN como no ácido ribonucleico (ARN). Estas alterações acontecem pela formação de ligações covalentes entre pirimidinas próximas entre si, levando ao aparecimento de fotoprodutos genotóxicos que causam respostas inflamatórias e mais tarde génese tumoral. A radiação ultravioleta C (UVC) provoca danos que são reparáveis pelas enzimas de reparação do ADN sendo responsável por cancros cutâneos em situações raras (Ouhtit, Muller, Gorny & Ananthaswamy, 2000).

1.3 Carcinoma das células escamosas

O carcinoma das células escamosas é dos tumores cutâneos mais comuns, com origem nos queratinócitos que residem na epiderme (Losquadro, 2017). A porção da epiderme afetada é constituída por epitélio escamoso, que compõe a maioria da pele, forrando a cavidade oral e o esófago e formando o sabugo das úngulas e as almofadas plantares. Nos gatos é considerada uma doença geriátrica, sendo a idade média de ocorrência entre os dez e os doze anos (Murphy, 2013). A causa para o desenvolvimento e o comportamento do tumor irá variar de acordo com a localização de origem e as opções de tratamento dependem do estádio do tumor primário (Murphy, 2013).

1.3.1 Incidência de carcinoma das células escamosas em gatos

Segundo o estudo de Miller *et al.* (1991), os tumores da pele correspondem a 9,6% de todas as necrópsias e biópsias realizadas em felinos (durante os 41 meses do estudo). Dentro do total de tumores da pele avaliados na espécie, 15,2% foram carcinomas das células escamosas, sendo a cabeça o local de origem mais comum e dentro desta, os pavilhões auriculares os mais afetados. Foi possível concluir que os tumores cutâneos correspondem a 29,6% de todos os neoplasmas diagnosticados em gatos e, como tal, um dos cancros mais frequentes nesta espécie.

1.3.2 Fatores de risco associados ao desenvolvimento de carcinoma das células escamosas em gatos

Os principais fatores de risco relacionados com desenvolvimento de cancro da pele em animais de companhia são a exposição cumulativa a radiação UV, doenças dermatológicas e queimaduras, inflamação crónica, imunossupressão e infeções virais (Fahradyn *et al*., 2017; Pinello *et al*., 2022). Referente as estas últimas, há cada vez mais evidências de que o papilomavírus poderá ser uma das causas de CCE e CCB em felinos (Munday, Thomson & Luff, 2017; Sunberg *et al*., 2000).

A exposição cumulativa a elevadas doses de UVB e, em menor grau, de UVA é o principal fator de risco para o desenvolvimento de CCE (Losquadro, 2017). Tumores causados por UVB aparecem, maioritariamente, na cabeça dos animais, sendo que, animais de pelagem branca ou com manchas brancas apresentam maior predisposição (Murphy, 2013). Dorn, Taylor & Schneider (1971) descreveram um risco de desenvolvimento de CCE 13,4 vezes superior em gatos brancos.

Apesar de gatos siameses se encontrarem sobre representados em registos sobre cancro, o recente estudo de Pinello *et al.* (2022) não identificou evidências desta predominância, bem como qualquer predisposição associada a neoplasias nesta raça. Já Miller *et al.* (1991) e Murphy (2013) afirmam, referindo especificamente os CCE, que por terem orelhas de pigmentação e pelagem escura, os gatos siameses estão naturalmente protegidos contra CCE. O mesmo será esperado em gatos (de raça não siamesa) com pelagem siamesa.

O pelo atua como barreira protetora, logo gatos de pelagem comprida poderão ter menor incidências destes tumores (Murphy, 2013).

Um animal imunodeprimido apresenta uma maior probabilidade de desenvolver CCE devido à perda de imunovigilância, que tem um papel central como mecanismo de defesa nos estádios neoplásicos iniciais. Adicionalmente, apresenta maior suscetibilidade de contrair e manter cronicamente uma infeção de papilomavírus. (Hauck, 2012).

1.3.3 Patofisiologia e apresentação clínica de carcinomas das células escamosas em gatos

Os CCE têm origem na proliferação descontrolada de queratinócitos epidérmicos atípicos e resulta de um processo displásico crónico intraepidérmico. O desenvolvimento de malignidade é progressivo, sendo que o tecido normal evolui inicialmente de queratose actínica para um carcinoma *in situ* e, eventualmente, um CCE invasivo (Fania *et al*., 2021; Marticorena *et al*., 2015; Murphy, 2016) (Figura A4).

A queratose actínica felina é considerada uma lesão pré-neoplásica e está presente nos estádios iniciais do desenvolvimento de CCE (Favrot, Welle, Heimann, Dodson & Guscetti, 2009). Tanto esta como um CCE bem estabelecido, resultam de um processo complexo que envolve mutações de genes com funções relacionadas com a homeostasia epidérmica, que promovem a proliferação descontrolada de queratinócitos atípicos. Contudo, mutações idênticas estão presentes, por vezes, em queratinócitos normais, principalmente nos que constituem a pele cronicamente exposta ao sol (Martincorena *et al.*, 2015).

A manifestação clínica da doença ocorre de acordo com o tipo de lesão presente e de acordo com a fase de progressão de malignidade.

O processo inicia-se com a queratose actínica, que se manifesta sob a forma de lesões crostosas, únicas ou simétricas, papilares ou em forma de placas, presentes sobretudo na ponta das orelhas, no plano nasal e pálpebras de gatos (Favrot *et al.,* 2009). De seguida, o CCE *in situ* (também designada de doença de Bowen) apresenta-se sob a forma de placas crostosas, vermelhas e bem demarcadas, na pele exposta ao sol como cabeça, pescoço e extremidades (Kossard & Rosen, 1992). A maioria dos gatos com CCE invasivo provocado por exposição solar apresenta lesões eritematosas e crostosas ou úlceras persistentes em forma de crateras que não cicatrizam (Kallini, Hamed & Khachemoune, 2015; Murphy, 2013). Geralmente, são também identificáveis alterações actínicas óbvias nas orelhas do animal, que estão espessadas e enroladas nas extremidades, tornando-se mais crostosas, com erosão da ponta da orelha (Murphy, 2013) (Figura 1).





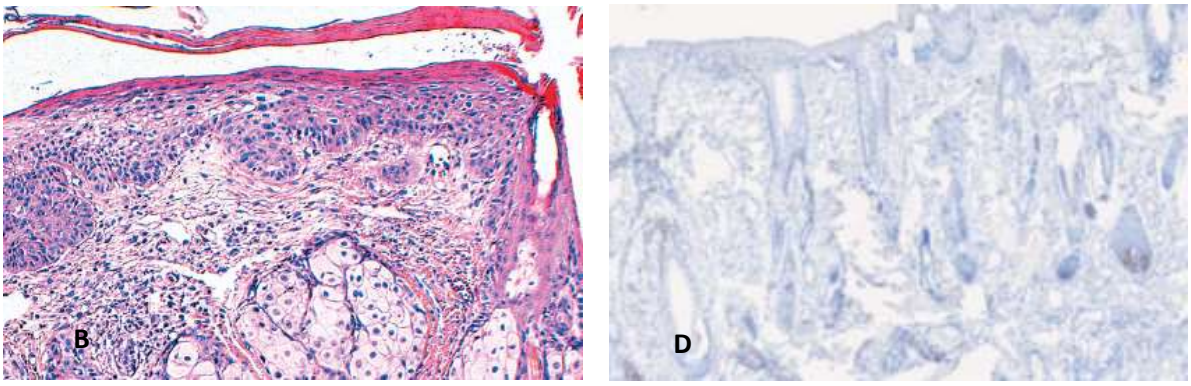


Figura 1 – Apresentação clínica e histológica da queratose actínica e carcinoma das células escamosas *in situ*. **A**- Queratose actínica num gato de pelagem branca. **B-** Imagem histológica da queratose actínica, coloração hematoxilina-eosina (Fotografias originais de Favrot *et al,* 2009). **C**- Carcinoma das células escamosas do plano nasal (Adaptado de Brooks, 2007). **D**- Imagem histológica do carcinoma das células escamosas do plano nasal, marcação de células com Ki-67 visível através da coloração DAB e hematoxilina de Mayer (objetiva 2,5x).

Nem toda a cabeça do gato está exposta à mesma quantidade de radiações UV durante o mesmo período de tempo e, como tal, é possível identificar-se lesões pré-cancerosas, ou seja, actínicas, e CCE já desenvolvido na mesma área, ao mesmo tempo. Os gatos podem apresentar lesões na ponta das orelhas, no plano nasal e nas pálpebras em simultâneo (Murphy, 2016).

As manifestações clínicas são também variáveis de acordo com o grau de diferenciação da lesão. Os CCE bem diferenciados apresentam-se como placas ou nódulos crostosos. Já os mal diferenciados são geralmente lesões moles, ulceradas e, por vezes, hemorrágicas (Esther, Lamps & Schwartz, 1999). Dependendo da extensão da lesão, os CCE podem ser classificados como CCE não metastizado e metastizado, sendo que os primeiros são facilmente removidos cirurgicamente (Stratigos et al., 2020).

Dos Santos *et al.* (2023) realizaram um estudo de modo a avaliar a prevalência de metástases regionais e à distância de CCE em cães e gatos, ao longo de 36 anos. Relativamente aos felinos, verificou-se que a prevalência de metastização à distância foi de 5,3% e que os linfonodos regionais foram invadidos por células malignas em 66% dos gatos avaliados, sendo consideravelmente frequente a metastização em órgãos distantes.

1.3.4 Métodos de diagnóstico e de prognóstico

O melhor método de diagnóstico, em casos de CCE, consiste na realização de biópsias excisionais ou incisionais através de *punch* ou bisturi. A maioria das lesões encontra-se

demasiado superficial e/ou inflamada para permitir um diagnóstico fidedigno através de punção aspirativa de agulha fina. Frequentemente, estão presentes várias regiões afetadas, pelo que várias amostras de diferentes locais devem ser recolhidas e colocadas em recipientes diferentes, de modo a que as lesões mais agressivas sejam corretamente identificadas (Murphy, 2013).

Nos casos de cancro, a sua identificação precoce, obtenção de informação da sua extensão e agressividade é importante. Para além de métodos de diagnóstico, cada vez mais os fatores de prognóstico são utilizados como referência para melhor compreender cada caso de CCE.

O efeito prognóstico da integridade e qualidade das margens cirúrgicas é considerado ambíguo (Soltero-Rivera, Krick, Reiter, Brown & Lewis, 2014). Uma vez que alguns dos métodos mais tradicionais apresentam fraca aplicabilidade em CCE, iniciou-se a busca por novos métodos com valor prognóstico. Por exemplo, vários estudos dedicam-se à avaliação de possíveis alterações na expressão de determinadas proteínas através de imunohistoquímica.

A identificação de p53 em CCE tem sido sugerido como fator de prognóstico em humanos. Devido ao seu reduzido tempo de semivida, a forma não mutada da p53 não é passível de ser identificada por imunohistoquímica. Pelo contrário, a capacidade de identificação de uma forma detetável desta proteína implica a ocorrência de mutações na sequência genética que a codifica (Hauck, 2012). Segundo Murakami, Tateyama, Rungsipipat, Uchida & Yamaguchi, (2000), esta proteína é detetada com significativa prevalência em CCE em gatos, tendo sido identificada em 40% dos casos de CCE bem diferenciados e 80% dos mal diferenciados.

Sakai, Yamane, Yanai, Shirai & Masegi (2001) estudaram a proteína p27, uma proteína responsável por manter as células em estádio G_0 do ciclo celular. Esta fase corresponde a um estado de repouso indeterminado em que as células poderão permanecer desde dias a meses até reentrarem no ciclo celular (Alberts *et al.,* 2002ª). Perante lesões celulares ou como consequência do *turnover* fisiológico, a estimulação por mitogéneos resulta na saída do estado de quiescência e inicio da proliferação celular (Pollard, Earnshaw, Lippincott-Shwartz & Johnson, 2017). É igualmente possível que as células permaneçam nesta fase até à sua morte ou à do organismo a que pertencem (Alberts *et al.,* 2002ª). Sakai *et al.,* (2001) concluíram que a p27 se encontra em valores muito inferiores em CCE em comparação com formações neoplásicas cutâneas de origem benigna.

Outra proteína importante na regulação do ciclo celular, denomina-se ciclina. Esta é responsável pela ligação, ativação e fornecimento de substrato às quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Bloom & Cross, 2007). Estas enzimas, por sua vez, regulam a divisão celular

quando ativadas pela sua subunidade, a ciclina (Malumbres, 2012). A ciclina está presente em 90% dos CCE em gatos (Murakami *et a.l*, 2000).

A identificação de alterações em diferentes proteínas, mutações genéticas e vias ativadas no desenvolvimento de neoplasias da pele é essencial para otimizar a utilização de terapêutica especifica e evitar efeitos secundários nos tratamentos a nível cutâneos e noutros órgãos do animal (Hauck, 2012).

1.4 Biomarcadores com efeito prognóstico

Apesar do progresso no desenvolvimento de novos métodos preventivos, de diagnóstico, de classificação e terapêuticos, o CCE continua a ser dos tumores mais frequentes em gatos. Os animais afetados tornam-se desfigurados e incapacitados, seja pela progressão da doença ou por sequelas terapêuticas. Por este motivo, tem vindo a crescer o interesse em desenvolver biomarcadores com potencial prognóstico neste tipo de cancro (Caruntu *et al*., 2021). Biomarcadores, neste caso marcadores tumorais, são substâncias mensuráveis que fornecem informação sobre a existência de tecido tumoral no organismo (World Health Organization - WHO, 2021 citado Estaller *et al*., 2022). A sua identificação é realizada, comumente, através da técnica de imunohistoquímica.

Enquanto que em medicina humana, foram confirmados vários marcadores como indicadores da potencial presença de neoplasias, em medicina veterinária apenas alguns marcadores são utilizados, uma vez que a sua reduzida especificidade e sensibilidade limita o seu valor diagnóstico (Bryan, 2016).

1.4.1 Técnica de imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica laboratorial que apresenta por base a ligação específica entre anticorpos e antigénios de modo a localizar estes últimos em células e tecidos (Magaki, Hojat, Wei, So & Yong, 2020). Esta técnica é utilizada como componente na classificação de neoplasmas, determinação do local do tumor de origem em casos de metastização e, cada vez mais, como auxiliar na obtenção de prognóstico em casos de neoplasia maligna (Wolff *et al.,* 2013).

Existem essencialmente dois métodos − o método direto e o indireto. No primeiro o anticorpo primário encontra-se marcado e é diretamente aplicado no tecido. Contudo, este método não é preferido, pois está associado a um fraco sinal de deteção. No método indireto, é o anticorpo secundário que está marcado e que se liga ao anticorpo primário que, por sua

vez, se liga à proteína de interesse, permitindo amplificação de sinal e uso de diferentes anticorpos primários (Magaki *et al*., 2020).

O anticorpo primário pode ser mono ou policlonal. Os anticorpos monoclonais são preferíveis, pois apresentam especificidade para um único epítopo e como tal, tendem a ser mais específicos. Ao contrário, os anticorpos policlonais podem ligar-se a vários epítopos da mesma proteína, sendo por isso mais sensíveis (Magaki, Hojat, Wei, So & Yong, 2020).

1.4.2 Ki-67

A proliferação descontrolada é uma das características centrais de qualquer processo maligno. Esta pode ser identificada com recurso a diferentes métodos como a contagem de figuras de mitose em amostras de tecido coradas diretamente, através da incorporação de nucleótidos marcados no ADN e contagem celular através de citometria de fluxo (Suciu *et al*., 2014). Contudo, o método mais comum envolve a avaliação do antigénio Ki-67 através da técnica de imunohistoquímica (Dowsett *et al*., 2011). A Ki-67 é uma proteína nuclear (não-histona) presente em todas as células em proliferação ativa (G_1, S, G_2 e mitose), ou seja, em todas as fases do ciclo celular com exceção da G_0 (Scholzen & Gerdes, 2000). A sua expressão aumenta no contexto da proliferação celular e, como tal, torna-se significativamente interessante como biomarcador de proliferação (Estaller *et al*., 2022; Nishimura *et al*., 2010). Na interface, o antigénio Ki-67 encontra-se exclusivamente no núcleo. Durante a mitose este é identificado, na sua maioria, na superfície cromossomal à medida que os cromossomas se rearranjam para formar as células filhas (e os seus respetivos núcleos) (Scholzen & Gerdes, 2000). Os níveis antigénicos variam durante o ciclo celular, sendo mais reduzidos durante as fases G_1 e S, seguido de um acentuado crescimento durante a G_2, sendo o pico durante a mitose (Nielsen *et al*., 2021)

Durante a interpretação histológica dos tecidos tumorais, após a realização da técnica de imunohistoquímica, apenas células com os núcleos marcados devem ser utilizadas na classificação da Ki-67, que geralmente se refere à percentagem de células positivamente marcadas no total de células neoplásicas avaliadas. Qualquer coloração do citoplasma ou da membrana celular não deve ser valorizada. Tal como noutras marcações de imunohistoquímica, a observação de controlos positivos presentes inerentes às amostras tais como figuras mitóticas, células do tecido normais, linfócitos e células estromais e endoteliais, auxiliam na interpretação (Dowsett *et al*., 2011; Suciu *et al*., 2014).

O estudo de Soliman & Yussif (2016), afirma existir relação entre elevados valores (> 15%) de Ki-67 em amostras de tumores malignos da mama em mulheres com o elevado grau

de malignidade, ou seja, quanto maior a percentagem de Ki-67 identificado nos tecidos, mais malignos estes são.

No estudo de Estaller *et al*., (2022), cães foram divididos em três grupos: um grupo controlo de cães saudáveis, um grupo de cães com doenças não neoplásicas e um grupo com cães diagnosticados com tumores malignos. Concluiu-se que a concentração sérica de Ki-67 era significativamente mais elevada em animais com neoplasias do que em cães saudáveis e com doenças não neoplásicas.

Os estudos de Huuhtanen *et al.,* (1999) e Mohseni, Aboeerad, Sharifi, Tayangar & Mohajeri-Tehrani (2019) não identificaram nenhuma correlação entre o tamanho da neoplasia e níveis de Ki-67 teciduais, em humanos. Estaller *et al.*, (2022) verificou o mesmo com níveis séricos de Ki-67. Por outro lado, o estudo de Ragab, Samy, Afify, Maksoud & Shaaban (2018), observou uma relação positiva entre uma maior expressão de Ki-67 sérica e o tamanho tumoral. Se no futuro se comprovar que os níveis de Ki-67 são independentes do tamanho do tumor, este marcador poderá ser importante no diagnóstico de massas pequenas, não identificáveis através de métodos imagiológicos (Estaller *et al*., 2022).

O estudo de Xie *et al*., (2016) demonstrou que níveis elevados de Ki-67, avaliados através da técnica de imunohistoquímica, estão associados a pior prognóstico em doentes com carcinoma das células escamosas oral humano.

O estudo de Delgado, Brilhante-Simões, Garcez, Monteiro, Pires & Prada (2022) em CCE oral em cães identificou uma expressão elevada de Ki-67 em 25% dos casos avaliados.

A relação entre estes biomarcadores tumorais, incluindo o Ki-67, e as células inflamatórias é um foco importante na investigação oncológica. A identificação de células como neutrófilos, linfócitos e monócitos infiltradas no tecido pode auxiliar na classificação tumoral, associada ao índice de Ki-67 (Xu, Li, Wang, Ma & Zhang, 2021; Yilmaz, Demirang, Sullu & Yilmaz, 2021).

Uma vez que não existe padronização de protocolos de estudo de Ki-67 nos gatos, Soares, Ribeiro, Carvalho, Peleteiro, Correia & Ferreira estudaram a marcação do biomarcador em carcinomas mamários. Os autores concluíram que a maioria dos tumores primários com índices elevados de Ki-67 (72,9%), nomeadamente com índíces ≥ 14%, encontravam-se associados a metastização regional dos linfonodos. Adicionalmente, 93,8% dos casos com metastização à distância também apresentaram marcação de Ki-67 ≥ 14%.

Apesar de numerosos artigos em medicina humana e veterinária, incluindo os acima mencionados, relatarem uma associação positiva entre o Ki-67 e valor prognóstico, este não é utilizado na prática clínica uma vez que esta associação tem sido considerada incerta e, como tal, controversa (Xie et al., 2016).

1.5 Sistemas de classificação tumoral

A classificação do tumor de acordo com diferentes sistemas, permite entender a extensão da doença e categorizá-la de modo a adequar a abordagem terapêutica.

O primeiro sistema de classificação de malignidade para CCE surgiu em 1927, denominado “sistema de classificação de Borders”, com o objetivo de identificar o índice de malignidade de CCE labial humano. Mais tarde este foi validado e aplicado também em CCE cutâneos. Este sistema é simples e classifica os tumores em 4 graus de acordo com a diferenciação e queratinização do tumor (Sreeja *et al.,* 2020). Desde Borders, diversos autores aplicaram este sistema de classificação e criaram variações baseadas em diversos trabalhos experimentais, de modo a originar um sistema mais completo, principalmente para o CCE oral. Em 1992, Bryne *et al.*, criou uma nova versão do sistema de classificação de CCE que se destacou. Este sugere que determinadas características morfológicas e moleculares identificadas em diferentes áreas dentro de um mesmo tumor possuem menor valor prognóstico, quando comparadas com a área correspondente a frente invasora. Assim, o sistema de Bryne *et al.* (1992) foca-se na avaliação da frente invasora encontrada em profundidade no tumor em detrimento da totalidade da sua extensão, opostamente a sistemas anteriores. Após a introdução do sistema de Bryne, diversos estudos demonstraram que a aplicação do mesmo melhora consideravelmente o valor prognóstico (Sreeja *et al.,* 2020). As áreas histologicamente invasivas ganharam importância diagnóstica e clínica, visto que diferentes estudos sugerem que as mesmas poderão ser responsáveis pelo comportamento clínico da neoplasia (Akhter, Hossain, Rahman & Molla, 2011; Bryne, Koppang, Lilleng & Kjarheim, 1992). Em 2005, a WHO apresentou um novo sistema significativamente mais simples, tendo em conta apenas o grau de diferenciação tumoral. Este sistema classifica os tumores como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e mal diferenciados (Sreeja *et al.*, 2020).

Os CCE bem diferenciados são a variante histológica identificada mais frequentemente, em gatos e em cães (Goldschmidt & Goldschmidt, 2017 citado por Corrêa *et al.,* 2021). Estes são constituídos por grupos de células neoplásicas com origem na epiderme e que invadem a derme, dispostos em ilhas e trabéculas. Nestes casos, são encontradas acumulações características de queratina laminada e/ou pérolas de queratina, geralmente no centro do tumor. Processos inflamatórios são maioritariamente identificados na região periférica do tumor, contudo a infiltração do estroma por células inflamatórias (nomeadamente neutrófilos) é evidente. A atividade mitótica varia de moderadamente reduzida a moderadamente elevada (Goldschmidt & Goldschmidt, 2017; Mauldin & Kennedy, 2016; Weiss & Frese, 1974 citados por Corrêa *et al*. 2021). A arquitetura dos tumores mal diferenciados não varia consideravelmente dos tumores bem diferenciados, sendo que as

células neoplásicas estão dispostas em feixes e cordões. O estroma é constituído por menor quantidade de colagénio, as pérolas de queratina não são identificáveis e a atividade mitótica é moderada a elevada com importante atipia mitótica (Goldschmidt & Goldschmidt, 2017; Mauldin & Kennedy, 2016; Weiss & Frese, 1974 citados por Corrêa *et al*. 2021).

Contudo, ter como único critério de avaliação de malignidade a diferenciação tumoral ignora a complexidade de cada tumor individual e descarta a influência de outros parâmetros igualmente importantes. Estudos em medicina humana corroboram a necessidade da utilização de sistemas de classificação de malignidade tumoral com recurso a múltiplos parâmetros de avaliação de modo a tornar o prognóstico mais fidedigno, tanto para CCE orais como cutâneos (Lourenço, Schueler, Camisasca, Lindenblatt & Bernardo, 2007).

1.5.1 Sistema de classificação da Associação Mundial de Saúde

O sistema de classificação universalmente utilizado foi desenvolvido pela Associação Mundial de Saúde (WHO) e denomina-se de tumor-nódulos-metástase (TNM) (Beveridge & Sobin, 1974).

O primeiro elemento desta classificação é o tumor propriamente dito, designado com a letra T (Tabela 12). O estadiamento de um CCE cutâneo primário é realizado de acordo com as dimensões da lesão em centímetros (cm), a profundidade da invasão do tumor e a presença de características de elevado risco, referentes ao risco de recorrências ou de metástase. No caso do CCE humanos são considerados como fatores de alto risco, espessura > 2 milímetros (mm), crescimento do tumor em redor de um nervo, localização na orelha ou na região da boca e pobre diferenciação celular (Bicharkjian *et al.,* 2017).

Tabela 12 – Classificação do CCE em diferentes estádios de acordo com as suas dimensões e profundidade de invasão com correspondente descrição (Adaptado de Murphy, 2013).

Estádio	Descrição
TX	Incapacidade de avaliação do tumor primário
T0	Ausência de evidência do tumor primário
Tis	Carcinoma pré-invasivo (carcinoma *in situ*), sem invasão da membrana basal (apenas na epiderme)
T1	Tumor com < 2 cm de diâmetro, superficial ou exofítico, com < 2 características de elevado risco
T2	Tumor com 2-5 cm de diâmetro, ou com invasão mínima independentemente da sua dimensão, com ≥ 2 caraterísticas de elevado risco

T3	Tumor com > 5 cm de diâmetro, ou com invasão do tecido subcutâneo independentemente da sua dimensão
T4	Invasão tumoral de outras estruturas como a fáscia, músculo, osso e/ou cartilagem

O elemento seguinte desta classificação designa-se com a letra N e refere-se à invasão neoplásica dos linfonodos próximos ao local do tumor de origem (Tabela 13). Um dos sinais da possível disseminação tumoral é o aumento e tumefação dos linfonodos e é identificável através de métodos de diagnóstico imagiológicos (Bicharkjian *et al.,* 2017).

Tabela 13 – Classificação do CCE de acordo com a disseminação para os linfonodos, adaptado da medicina humana (Adaptado de Bicharkjian *et al.,* 2017).

Estádio	**Número de linfonodos afetados**	**Localização dos linfonodos afetados**	**Tamanho das metástases**
NX	-	Incapacidade de avaliar os linfonodos regionais	-
N0	0	Não identificado	Não identificado
N1	1	Ipsilateral ao tumor primário	≤3 cm
N2a	1	Ipsilateral ao tumor primário	3-6 cm
N2b	1	Ipsilateral ao tumor primário	≤6 cm
N2c	>1	Contralateral ao tumor primário ou em ambos os lados do corpo	≤6 cm
N3	≥1	Em qualquer linfonodo próximo do tumor	>6 cm

O último elemento desta classificação designa-se pela letra M e refere-se à presença de metástases à distancia (Tabela 14).

Tabela 14 – Classificação do CCE de acordo com a presença de metástases à distância (Adapatdo de Bicharkjian *et al.,* 2017).

Estádio	**Descrição**
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Após esta classificação a informação é combinada de modo a atribuir-se um estádio (Tabela 15). Quanto maior o estádio, pior o prognóstico.

Tabela 15 – Estadiamento de acordo com a categorização do tumor segundo o sistema TNM (Adaptado de: Bicharkjian *et al.,* 2017).

Estádio	Categoria T	Categoria N	Categoria M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
III	T1/T2/T3	N1	M0
	T1/T2/T3	N2	MO
IV	Qualquer T	N3	M0
	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.5.2 Sistema de classificação adaptado de Bryne por Nagamine *et al.* (2017)

Os CCE são tumores complexos, constituídos por grupos celulares heterogéneos com diferenças fenotípicas entre si (Bryne, Koppang, Lilleng, Stene, Bang & Dabelsteen, 1989; Bryne, Koppang, Lilleng & Kjaerheim, 1992). As células do centro da neoplasia apresentam maior grau de diferenciação do que as presentes na frente invasora, sendo que esta constitui a região tumoral que invade ativamente o estroma do tecido afetado. São as células pertencentes a esta frente que, provavelmente, representam o verdadeiro comportamento biológico e maligno dos CCE (Bryne, Koppang, Lilleng, Stene, Bang & Dabelsteen, 1989; Bryne, Koppang, Lilleng & Kjarheim, 1992). O estudo de Nagamine *et al.* (2017) revelou que as células pertencentes à frente invasora manifestam padrões celulares mais invasivos e menor grau de diferenciação, quando comparadas com células tumorais do centro ou superfície tumoral, para CCE orais e cutâneos.

De modo a avaliar o grau de malignidade dos CCE orais e cutâneos em cães, tendo em conta a importância da frente invasora, Nagamine *et al.* (2017) adaptou o sistema de classificação original de Bryne, que foi utilizado no presente estudo (Tabela 16).

Este sistema é multifatorial e visa o estudo de cinco parâmetros, sendo eles: grau de queratinização; padrão de invasão; inflamação; pleomorfismo nuclear e índice mitótico (número de mitoses contadas em 10 campos aleatórios do tumor numa amplificação de 40x).

O grau de queratinização é importante, uma vez que a queratina se encontra caracteristicamente em tumores bem diferenciados, sob a forma de lâminas e pérolas de queratina (Goldschmidt & Goldschidt, 2017 citados por Corrêa *et al*. 2021). O padrão de invasão, referente à forma como as células neoplásicas se arranjam e se dispõem aquando da invasão dos tecidos adjacentes, poderá ser indicativo de malignidade tumoral (Corrêa *et al*., 2021). A presença de infiltrado inflamatório é indicativo de uma resposta imunitária ativa do organismo contra o tumor, contudo como acima descrito, a inflamação também poderá estar associada ao desenvolvimento e progressão carcinogénica. No estudo de Ropponen, Eskelinen, Lipponen, Alhava & Kosma (1997) realizado em casos de CCE em medicina humana, a presença de resposta inflamatória estava positivamente associada a um prognóstico favorável, dado que na sua ausência, a invasão tumoral se encontra facilitada. A maioria dos sistemas de classificação de malignidade para CCE pontuam tumores com elevado grau de inflamação como sendo menos agressivos. O pleomorfismo nuclear diz respeito à variabilidade morfológica do núcleo e está associado à atipia celular. Por fim, o índice mitótico está relacionado com a proliferação descontrolada, que é uma característica central de processos malignos, sendo que quanto maior o número de mitoses atípicas, mais maligno tenderá a ser o tumor (Kesarkar *et* al. 2018).

Tabela 16 – Sistema de classificação do grau de malignidade para CCE orais e cutâneos em cães adaptado por Nagamine *et al*. (2017)

Pontuação	**1**	**2**	**3**	**4**
Grau de queratinização	Elevada queratinização (>50% das células)	Moderada queratinização (50% das células)	Mínima queratinização (5-20% das células)	Ausência de queratinização (0-5% das células)
Padrão de invasão	Marcada, bem delimitada, bordas infiltrativas	Cordões sólidos, bandas e/ou feixes	Pequeno grupo de cordões ou células (n>15)	Pequeno grupo de células dissociadas e/ou células individuais (n< 15)
Inflamação	Marcada	Moderada	Reduzida	Ausente
Pleomorfismo nuclear	Reduzido pleomorfismo nuclear (75%	Moderado a abundante pleomorfismo	Abundante pleomorfismo nuclear (25-	Extremo pleomorfismo nuclear (0-

	das células maduras)	nuclear (50-75% das células maduras)	50% das células maduras)	25% das células maduras)
Índice mitótico	0-1	2-3	3-4	>5

A pontuação associada dos 5 parâmetros é somada obtendo-se uma classificação entre 6 e 20. A classificação é realizada considerando a pontuação e agrupando os tumores em graus: Grau 1 (5 -10 pontos), Grau 2 (11-15) e Grau 3 (16-20).

1.6 Objetivos do presente trabalho sobre marcação de Ki-67 em CCE em gatos

A marcação de carcinomas das células escamosas com Ki-67 para avaliação do seu grau de proliferação pode ser uma ferramenta importante para a classificação, estadiamento e obtenção do prognóstico destes tumores em gatos. No entanto, ainda é necessária a sua validação neste tipo de tumores, bem como a padronização de protocolos para facilitar a sua contagem e torná-la objetiva usando ferramentas digitais. Assim, o presente estudo procura verificar a credibilidade da contagem desta marcação nuclear pelo QuPath (um *software openaccess* de análise digital de imagens).

Mais especificamente, o presente estudo apresenta como objetivos iniciais: (1) estudo da heterogeneidade proliferativa intratumoral através da marcação de Ki-67. Para tal, avaliou-se a concordância entre contagens aleatórias de marcação de Ki-67 realizadas em três áreas do tumor (regiões escolhidas aleatoriamente unicamente com células tumorais) e entre essas contagens e o valor médio de marcação de Ki-67 das contagens; (2) avaliação da necessidade de delineamento de áreas com apenas células tumorais, através da comparação entre os valores acima referidos e os valores da contagem de marcação de Ki-67 numa região denominada de “verdadeira aleatória”. Esta correspondente a uma região aleatória da lâmina, sem delineamento do grupo de células neoplásicas e com consequente inclusão de células do estroma associado ao tumor e células inflamatórias; (3) averiguação da presença de marcação de Ki-67 no estroma associado ao tumor e a sua influência nos valores da contagem “verdadeira aleatória”, através da seleção de áreas aleatórias de estroma e delineamento das mesmas de modo a incluir apenas células estromais (e eventuais células inflamatórias) nas contagens; (4) estudo da malignidade da frente invasora tumoral através do índice proliferativo da mesma, segundo a expressão de Ki-57. Para este fim, avaliou-se a discrepância de valores entre contagens realizadas em regiões à superfície do tumor (isto é, de células neoplásicas o

mais próximas possível da epiderme e derme fisiologicamente normais) e as contagens realizadas em regiões da frente invasora (regiões constituídas por células neoplásicas o mais distantes possível da epiderme e derme fisiologicamente normais).

De forma a poder aumentar a compreensão da biologia deste tumores, o último objetivo deste trabalho trata-se da (5) comparação das contagens de células positivas para este marcador de proliferação entre carcinomas de células escamosas de diferentes localizações anatómicas (cavidade oral, plano nasal e pavilhão auricular) e verificar se existe alguma relação entre estas e o sexo ou a idade do animal e ainda com o grau de agressividade tumoral, este último obtido de acordo com o sistema de classificação de malignidade adaptado de Nagamine *et al*., (2017).

2. Materiais e métodos

2.1 Obtenção de amostras para o projeto

As amostras analisadas foram obtidas com a colaboração do laboratório de análises clínicas veterinárias DNATech, sendo que foram aproveitadas amostras enviadas por diversas clínicas e hospitais veterinários com vista à obtenção de um diagnóstico histopatológico para as lesões observadas. No laboratório, os patologistas realizam uma primeira avaliação macroscópica, seguida da preparação dos tecidos para obtenção de lâminas, que por sua vez foram coradas com hematoxilina-eosina. Neste trabalho, os critérios de inclusão foram amostras de gatos com diagnóstico histopatológico de carcinoma das células escamosas com localização anatómica do tumor primário da cavidade oral, pavilhão auricular e plano nasal (as áreas em estudo). As fichas clínicas foram estudadas para caracterização (idade, sexo e raça) dos animais.

2.1.1 Descrição da amostra

O presente estudo centrou-se na avaliação de 25 amostras de CCE, sendo que 10 destes se apresentaram no pavilhão auricular (40%), 9 na cavidade oral (36%) e 8 no plano nasal (32%). Cada tumor corresponde a um animal, exceto no caso de dois animais que apresentavam mais do que uma região anatómica afetada em simultâneo: um animal com CCE na mucosa oral e no plano nasal e outro com CCE do pavilhão auricular e plano nasal. Cada tumor será tratado de forma individual.

2.2 Técnica de Imunohistoquímica

A técnica laboratorial foi realizada no laboratório de análises clínicas veterinárias DNATech.

A deteção da proteína nuclear Ki-67 foi feita com base na marcação de secções de parafina, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Foram realizados cortes com espessura de 3-4 µm dos blocos de parafina selecionados em lâmina adesivada, com incubação durante a noite na estufa a 37 °C. Em todas as lâminas com o tecido neoplásico a analisar foi adicionada uma amostra de tecido esplénico ou cutâneo de murganho saudável para servir como controlo positivo, validando desta forma a técnica. A desparafinação dos tecidos foi realizada com o equipamento *Giotto* (*DiaPath*), que permite realizar o processo automaticamente através do programa *DiaPath*. Este dura 20 minutos e consiste em banhos de xilol e reidratação numa sequência decrescente de álcool de 100% para 95% para 70% até água destilada. O segundo passo consiste na recuperação antigénica, realizada no equipamento *PT module* (*Thermo Scientific*) onde as lâminas são submersas numa solução a pH 9, a 88°C, durante 15 minutos. Após o arrefecimento, as lâminas foram retiradas da solução e colocadas num recipiente com água. Considerando que manter a hidratação das mesmas é essencial durante toda a técnica, todas as incubações que se seguem foram realizadas em câmara húmida. De seguida, os tecidos foram contornados com a caneta hidrofóbica *Super HT PAP Pen* (*Biotium*). Visto a revelação de sinal ser feita com recurso a peroxidase de rabanete (HRP) como reagente associado ao anticorpo secundário, a peroxidase endógena inerente aos tecidos em estudo necessita de ser bloqueada. Deste modo, as lâminas foram incubadas durante 15 minutos com uma solução bloqueadora de peróxido de hidrogénio (H_20_2) a 3% em tampão fosfato salino (PBS) (ref. 925B-04; *Cell Marque*™). Após lavagem com água destilada, os tecidos foram incubados com o anticorpo primário de rato monoclonal anti-antigénio Ki-67 humano (clone MIB-1; ref. M7240; *Dako*) durante 30 minutos numa diluição de 1:600 em *Normal Antibody Diluent (Phosphate Buffered)* (*ScyTek Laboratories*). As lâminas foram lavadas três vezes durante cinco minutos em PBS para remoção de complexos imunes relativos a ligações inespecíficas. Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário, *Amplifier for mouse and rabbit* (HiDef Detection HRP Polymer System, ref. CMC954080040; *Cell Marque*™), durante 10 minutos. Realizaram-se, novamente, três lavagens com PBS de cinco minutos intercaladas com água destilada. O próximo passo consistiu na colocação do substrato, que atua como corante da reação específica através da sua ligação à enzima associada ao anticorpo secundário. As lâminas foram incubadas com o substrato e *HRP Polymer detector* (HiDef Detection HRP Polymer System, ref. CMC954080040; *Cell Marque*™), durante 10 minutos e seguindo-se três lavagens de cinco minutos de PBS intercaladas com água destilada. Finalmente, as lâminas

foram incubadas durante oito minutos em cromogénio 3,3' diaminobenzina (DAB) (ref. ACB030; *ScyTek Labratories*) diluído em *DAB substrate buffer* (ref. ACC500; *ScyTek Labratories*) conforme as instruções do fabricante. O DAB regula a coloração do polímero adicionado anteriormente e fornece a coloração castanha das células marcadas, observável ao microscópio. As lâminas foram lavadas com água corrente e a coloração nuclear de contraste foi realizada com hematoxilina de Mayer (ref. CO302; *DiaPath*) durante um minuto, seguida de uma lavagem com água corrente durante três minutos. Por último, as lâminas foram desidratadas em banhos de concentração crescente de álcool até ao álcool 100% e depois xilol, sendo finalmente, montadas para observação ao microscópio.

As lâminas foram digitalizadas com o aparelho *Hamamatsu NanoZoomer*, com o programa *NDP Nanozoomer digital pathology V1.0.9.* (Figura 2).

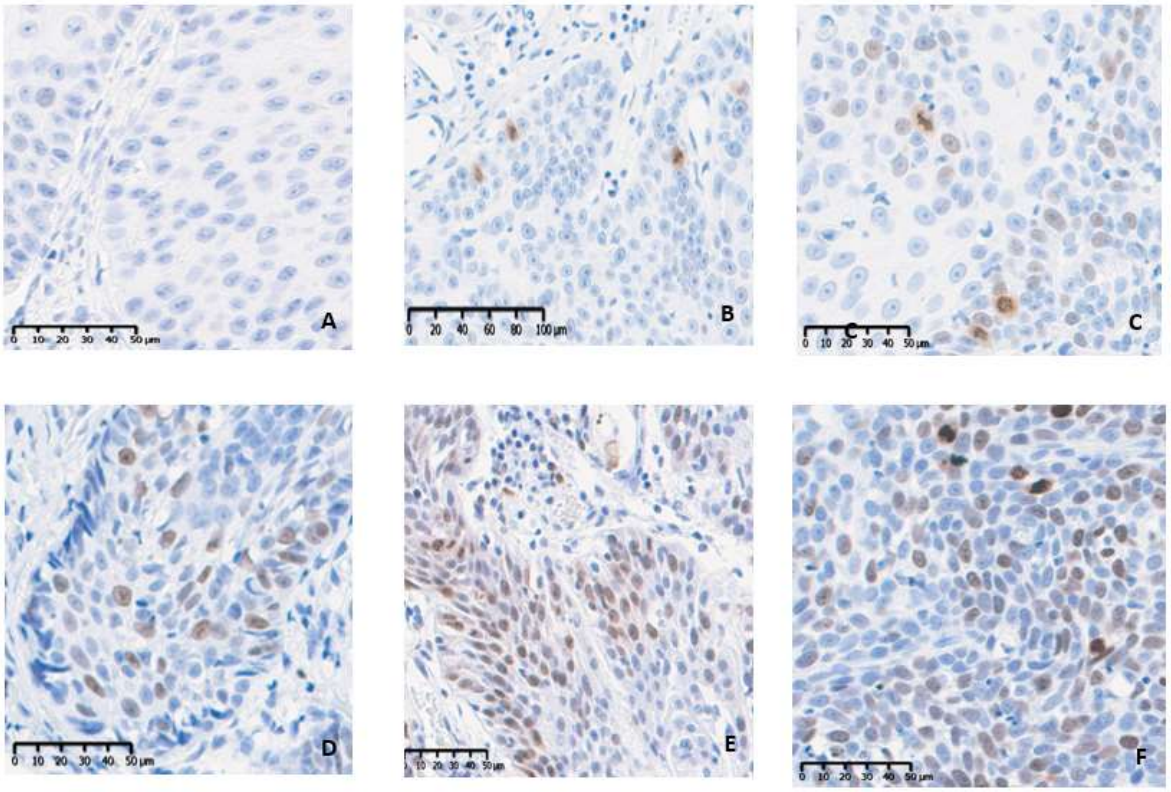


Figura 2 - Gradiente de marcação de Ki-67 através da coloração com DAB e contraste com Hematoxilina de Mayer. **A**- Marcação ausente; **B**- marcação bastante ligeira; **C**-marcação ligeira; **D**- marcação moderada; **E**- marcação evidente; **F**- marcação bastante evidente (objetiva de 40x).

2.3 Classificação do grau de malignidade de acordo com o sistema adapatado de Nagamine *et al.* (2017)

Cada lâmina foi avaliada individualmente, para obtenção de uma pontuação de acordo com o sistema de classificação de Nagamine *et al.*, (2017) acima descrito, avaliando-se o grau de queratinização, padrão de invasão, inflamação, pleomorfismo nuclear e índice mitótico

Apesar da classificação do estroma não estar contemplada no sistema selecionado, de modo a tornar o estudo mais completo, completou-se a classificação histológica visual das 25 lâminas, classificando-se a quantidade de estroma associado ao tumor em comparação com o tecido neoplásico em 3 categorias: abundante, denso (moderadamente abundante) e delicado (pouco abundante).

2.4 QuPath e avaliação patológica digital

O *software* escolhido para este trabalho designa-se QuPath (v.0.4.3). Este programa apresenta características inovadoras que permitiram a realização da classificação dos tecidos e contagem da expressão do Ki-67 de modo prático e mais fidedignamente. Para este trabalho foram usadas ferramentas para avaliar a presença, localização e frequência da expressão do Ki-67 em regiões especificas do tecido tumoral. Assim, foram selecionadas regiões do tecido e foram quantificados o número total de células, células negativas para a marcação de Ki-67, células positivas para esta marcação e a quantificação relativa de células positivas (incluindo a percentagem, número de células positivas por mm^2 e a área em μm^2).

Primeiramente, foram selecionadas regiões aleatórias, de modo a abranger pelo menos 1000 células e foi realizada a contagem dos parâmetros descritos. O mesmo foi realizado para a contagem “verdadeira aleatória” (que se diferencia das anteriores por incluir o estroma associado ao tumor). De seguida, selecionou-se a frente invasora e superfície do tumor e realizou-se a contagem dos mesmos parâmetros (Figura A5). Por fim, procedeu-se da mesma forma para secções selecionadas do estroma. A utilização de um programa digital para análise de imagem permitiu garantir que as medições realizadas fossem altamente precisas, consistentes e imparciais. Como tal, em todas as lâminas foram calibrados vários parâmetros com observação humana para confirmação de que apenas núcleos positivamente corados com DAB eram considerados. Apenas devem ser considerados e, consequentemente, contabilizados núcleos e figuras mitóticas positivamente marcadas pelo anticorpo anti-Ki-67 e corante DAB, independentemente da intensidade da coloração (Dowsett *et al.*, 2011; Skjervold, Pettersen, Valla, Opdahl & Bonfin, 2022).

O processo de avaliação das lâminas iniciou-se com uma inspeção visual metódica da totalidade do tecido, com consecutiva categorização de acordo com o sistema de classificação de Nagamine *et al.* (2017). De seguida, a lâmina digital foi configurada de modo a permitir a realização de anotações em todo o tecido. Antes da avaliação da marcação foram realizados ajustes nos vetores visuais de acordo com as diferentes colorações presentes, sendo neste caso, a hematoxilina e o DAB (com adição de um terceiro vetor representativo de coloração residual), sendo que a calibração dos três vetores foi feita através da opção "auto" sempre que uma nova região dentro do tumor era selecionada. Finalmente, iniciou-se a deteção de células com marcação positivas e com vista a aperfeiçoar o processo, foram otimizados os parâmetros pertinentes, de modo a que apenas as células com os critérios acima descritos fossem contabilizadas.

As secções do tecido a serem analisadas foram delineadas manualmente e depois aplicados os parâmetros específicos para as regiões aleatórias, superfície tumoral, frente invasora e para o estroma associado ao tumor (Tabela 17). Selecionaram-se secções onde a presença da expressão de Ki-67 fora fácil de identificar visualmente, sendo que áreas com presença de artefactos resultou em exclusão das mesmas como viáveis para contagem deste biomarcador.

Tabela 17 – Parâmetros utilizados para contagem das células positivamente marcadas para Ki-67 (marcação nuclear) das regiões tumorais aleatórias, superfície, frente invasora e estroma no programa QuPath.

Parâmetros	Contagens em regiões tumorais aleatórias, superfície e frente invasora	Contagens em estroma
Detection image	*Hematoxylin OS*	*Hematoxylin OS*
Requested pixel size	*0.4 µm*	*0.5 µm*
Background radius	*8 µm*	*8 µm*
Median filter radius	*1.1 µm*	*0 µm*
Sigma	*1.8 µm*	*1.5 µm*
Minimun area	*10 µm*	*10 µm*
Maximum área	*350 µm*	*400 µm*
Treshold	*0.02 µm*	*0.1 µm*
Max background intensity	*3 µm*	*2 µm*
Cell expansion	*5 µm*	*5 µm*
Threshold 1+	*0.15 µm*	*0.2 µm*
Nucleus	*DAB OD mean*	*DAB OD mean*

2.5 Análise estatística das contagens celulares

A análise estatíctica foi realizada em colaboração com o Professor David Ramilo. A informação sobre os animais de onde os tumores eram originários (sexo, idade, raça e região anatómica do tumor) foi compilada numa folha de cálculo Excel, associando-se a esta o registo das contagens celulares com marcação com a proteína Ki-67 realizadas com o programa QuPath para exportação para o programa estatístico *Statistical Package for Social Science* (IBM®SPSS®; v.25;) para análise estatística. Para todas as variáveis foi verificada a normalidade da distribuição dos dados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk. Nas comparações entre dois grupos foram usados o teste *t-student* para amostras emparelhadas para valores com distribuição normal e o teste não-paramétrico Wilcoxon para valores com distribuição não normal.

Para verificar se fatores como o número de células contadas e a densidade celular foram fatores de confusão, e como tal tiveram influência nos resultados obtidos, foram realizados modelos multivariados.

Para avaliar a influência das variáveis (sexo, idade, localização anatómica e grau de agressividade e as contagens de Ki-67), foram utilizados o teste ANOVA unifatorial para distribuições normais ou o teste não paramétrico equivalente, U de Mann-Whitney no caso de distribuições não normais. Em ambos os casos, na sequência de deteção de diferenças significativas entre os grupos, foram aplicados testes *post-hoc*.

Para a verificação da associação de duas variáveis categóricas utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson.

Em todos os testes estatísticos aplicados, as diferenças entre grupos foram consideradas como significativas quando $p<0,05$.

3. Resultados

3.1 Classificação visual dos CCE quanto ao grau de malignidade de acordo com o sistema adaptado por Nagamine *et al.* (2017)

O grau de agressividade dos 25 tumores em estudo foi avaliado conforme a classificação de Nagamine *et al.,* (2017) (Tabela 16) através de avaliação histológica. De acordo com a pontuação atribuída, 23 tumores foram classificados como grau 1 e 2 tumores como grau 2. Os tumores de grau 1 apresentam pontuações entre 5 e 10, dependendo da intensidade da presença dos diferentes componentes avaliados (grau de queratinização, padrão de invasão, inflamação, pleomorfismo nuclear e mitoses por campo). Os pertencentes ao grau 2 apresentam pontuações de 11 e 12 (Figura A6).

Referente à avaliação qualitativa do estroma associado ao tumor, das 25 amostras, 12 apresentam estroma abundante (48%), 6 com estroma denso (24%) e 7 com estroma delicado (28%). Comparando esta classificação com a pontuação obtida pelo sistema de classificação de Nagamine *et al*. (2017), verificou-se que os tumores com as pontuações mais elevadas (e como tal mais agressivos) apresentam tanto estromas abundantes como delicados, com os tumores menos agressivos apresentando maioritariamente estromas densos. Da mesma forma, verificou-se que a marcação de Ki-67 estromal apresenta os seus valores mais elevados nos tumores mais agressivos (segundo este sistema de classificação), independentemente da quantidade de estroma.

Nos tumores que apresentaram diferenças de marcação de Ki-67 evidentes para as contagens do estroma e da "verdadeira aleatória", averiguou-se (através da comparação visual entre a totalidade dos tumores) se teriam um grau superior de infiltração por células inflamatórias. Concluiu-se que os tumores da cavidade oral são, visualmente, os que apresentam maior grau de inflamação (associado a contagens elevadas nas regiões mencionadas). Neste trabalho, o local anatómico onde os tumores apresentaram aparentemente maior inflamação, associada a elevada marcação de Ki-67 estromal e da "verdadeira aleatória" trata-se da cavidade oral.

3.2 Resultados das contagens de marcação de Ki-67

3.2.1 Estudo da heterogeneidade intratumoral para a marcação da proteína Ki-67

3.2.1.1 Estudo da concordância entre três contagens de marcação de Ki-67 aleatórias e entre as mesmas e a média da lâmina

Primeiramente, foi necessário realizar-se a validação do método de contagem utilizado. Para tal, foram comparadas contagens realizadas em três áreas aleatórias diferentes do tumor, exclusivamente com células tumorais, para testar a presença de diferenças entre elas. Observou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre as contagens das diferentes áreas de células tumorais dentro do mesmo tumor.

Seguidamente, pretendeu-se verificar se os valores das três contagens aleatórias seriam significativamente diferentes do valor médio de marcação por lâmina. Contudo, não foi identificada uma diferença estatisticamente significativa entre as contagens das áreas individuais e a contagem média da marcação da lâmina (média das três contagens realizadas).

O número de células contadas e a densidade celular poderiam ter atuado como fatores de confusão e influenciado os resultados. Foi, porém, comprovado que estas variáveis não foram fatores de confusão das contagens aleatórias.

Tabela 18 – Homogeneidade intratumoral: percentagem média de células positivamente marcadas com Ki-67 em três regiões tumorais alectórias e média da marcação tumoral total das 25 amostras, com respetivos erros padrão da média.

Região tumoral 1 (%)	Região tumoral 2 (%)	Região tumoral 3 (%)	Total lâmina (%)
11,80 ± 2,22	9,67 ± 2,06	9,49 ± 1,87	10,71 ± 1,60

3.2.1.2 Estudo de comparação entre contagens aleatórias de células tumorais e a contagem "verdadeira aleatória".

De seguida realizou-se a comparação entre as três contagens aleatórias em zonas com apenas células tumorais e a "verdadeira aleatória". As contagens aleatórias foram conseguidas através da contagem da marcação de Ki-67 em áreas do tumor aleatórias, mas onde se incluiu exclusivamente células tumorais na contagem. A "verdadeira aleatória" corresponde uma contagem por lâmina onde a área avaliada foi selecionada aleatoriamente com inclusão (em maior ou menor quantidade) de células tumorais, estromais e inflamatórias. Verificou-se que não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores destes dois tipos de contagens.

Adicionalmente, concluiu-se que o número de células contadas e a densidade de celular do tecido avaliado não foram fatores de confusão da contagem "verdadeira aleatória".

Tabela 19 – Homogeneidade intratumoral: percentagem média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente ás contagens "verdadeira aleatória" e média tumoral, com respetivos erros padrão da média.

Total "verdadeira aleatória" (%)	Total tumor (%)
8,79 ± 1,29	10,71 ± 1,60

3.2.2 Estudo da influência do estroma na contagem "verdadeira aleatória"

Uma vez que a contagem "verdadeira aleatória" abrange porções do estroma associado ao tumor (incluindo células inflamatórias que o infiltram) é necessário estudar se estas porções de tecido influenciam esta contagem. Para tal, comparou-se valores da contagem "verdadeira aleatória" com valores médios de marcação positiva ao antigénio Ki-67 no estroma associado ao tumor. Verificou-se que existe uma diferença significativa entre ambas as contagens (p= 0,001), sendo que a média de marcações com Ki-67 no estroma é significativamente inferior (média de 2,70± 0,62 da percentagem de células positivamente marcadas) do que os de células tumorais (média de 10,71± 1,60 de percentagem de células positivamente marcadas). Isto é, os valores de marcação estromal são demasiado reduzidos para influenciar as contagens "verdadeiras aleatórias"

Tal como verificado com a contagens das restantes zonas, também o número de células contadas e a densidade de células não foram considerados fatores de confusão da contagem de células do estroma.

Tabela 20 – Heterogeneidade intratumoral: percentagem média de células positivamente marcadas com Ki-67 em três regiões do estroma, a média da marcação estromal e tumoral total das 25 amostras, com respetivos erros padrão da média.

Região estromal 1 (%)	Região estromal 2 (%)	Região estromal 3 (%)	Total estroma (%)	Total tumor (%)
2,49 ± 0,62	3,28 ± 0,92	2,99 ± 0,89	2,70 ± 0,62	10,71 ± 1,60

3.2.3 Estudo da relevância da frente invasora para a classificação do grau de agressividade tumoral

3.2.3.1 Estudo comparativo entre os resultados das contagens de marcação de Ki-67 na frente invasora com os da superfície tumoral

Para o estudo da marcação positiva de Ki-67 da frente invasora tumoral foi necessária a sua comparação com a região oposta a si, ou seja, a superfície do tumor. Após a realização de contagens em ambas as áreas opostas realizou-se a comparação dos valores médios por lâmina. No caso das amostras usadas para este estudo, verificou-se que a demarcação da superfície tumoral e da frente invasora não foi possível num tumor localizado na cavidade oral, pelo que os resultados desta análise referem-se apenas aos restantes. Os resultados foram

considerados não estatisticamente significativos, não havendo uma diferença significativa entre valores de marcação destas zonas.

Tal como anteriormente, determinou-se que o número de células contadas e a densidade celular não foram fatores de confusão da contagem de células da frente invasora.

Tabela 21 – Homogeneidade intratumoral: percentagem média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente ás contagens da superfície tumoral e frente invasora, com respetivos erros padrão da média.

Total superfície tumoral (%)	**Total frente invasora (%)**
9,55 ± 1,55	10,37 ± 2,05

3.2.3.2 Estudo comparativo entre as contagens da marcação do Ki-67 entre as contagens aleatórias e a frente invasora

De modo a averiguar a relevância da frente invasora aquando do estudo tumoral, nomeadamente através da marcação de Ki-67, é necessário também entender se existem diferenças consideráveis entre os valores da frente invasora e os valores aleatórios em diferentes áreas do tumor (maioritariamente do centro do tumor). Concluiu-se que os resultados foram considerados não estatisticamente significativos, dado que não foram identificadas diferenças entre as contagens avaliadas.

Tabela 22 – Homogeneidade intratumoral: percentagem média da marcação de Ki-67 total das 25 amostras, referente ás contagens das regiões aleatórias e frente invasora, com respetivos erros padrão da média.

Total frente invasora (%)	**Total tumor (%)**
10,37 ± 2,05	10,71 ± 1,60

3.2.4 Influência de quatro variáveis (sexo, idade, localização anatómica e grau de agressividade) sobre a marcação de Ki-67 (aleatória, "verdadeira aleatória", frente invasora e superfície tumoral)

3.2.4.1 Localização anatómica (cavidade oral, pavilhão auricular e plano nasal) Versus (Vs.) Idade e Grau de agressividade

As amostras utilizadas para o presente trabalho têm origem em animais com diferentes características, sendo que os tumores apresentam diferenças que lhes são inerentes e que podem correlacionar-se formando padrões visíveis.

A comparação da média das idades entre localizações anatómicas do tumor não revelou um valor estatisticamente significativo. Logo, não existe influência da idade no desenvolvimento de CCE em determinadas localizações nas amostras em estudo.

Da mesma forma, diferenças entre o grau de agressividade não foram estatisticamente significativas entre as três localizações anatómicas estudadas. Como tal, estas duas variáveis aparentam não ter uma relação nas amostras em estudo.

3.2.4.2 Localização anatómica (cavidade oral, pavilhão auricular e plano nasal) Vs. Sexo

No caso do estudo da influência do sexo dos animais na localização anatómica do tumor, foi identificada uma associação entre as variáveis. Na amostra estudada, os tumores do pavilhão auricular foram mais frequentes nas fêmeas e os tumores do plano nasal nos machos. Os tumores da cavidade oral mostraram igual probabilidade de aparecer nos dois sexos. Devido ao reduzido tamanho do grupo de amostras, estes resultados deverão ser considerados de forma reservada.

3.2.4.3 Sexo Vs. Idade e Grau de agressividade

Aquando do estudo da associação entre o sexo e a idade dos animais, não se encontrou uma associação estatisticamente significativa, ou seja, o sexo não influenciou a idade com que estes tumores se desenvolvem nos animais nas amostras analisadas e vice-versa.

Do mesmo modo, o estudo do sexo dos animais e a agressividade do tumor não revelou, igualmente, resultados estatisticamente significativos ($p=0,854$), pelo que não aparenta existir uma predisposição para machos ou fêmeas de apresentar CCE mais ou menos agressivos.

3.2.4.4 Idade Vs. Grau de agressividade

Ao averiguar a correlação entre a idade dos animais selecionados e o grau de agressividade tumoral, verificou-se que não existe uma correlação estaticamente significativa entre as duas variáveis em estudo. Isto significa que, tumores com classificações de malignidade superior não apresentam predisposição para se desenvolver em animais com determinadas idades, nomeadamente, animais mais velhos.

3.2.5 Estudo comparativo entre a localização anatómica e as contagens da marcação positiva para Ki-67 (aleatória, frente invasora e estroma)

Por fim, visou-se estudar a existência de variações entre as diversas contagens realizadas (aleatória, da frente invasora e do estroma) nas diferentes localizações anatómicas do tumor.

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as contagens aleatórias e as realizadas na frente invasora em tumores com localização no pavilhão auricular e no plano nasal ($p=0,032$). Isto indica que a marcação de Ki-67 é superior em contagens aleatórias e da frente invasora em tumores do plano nasal (15,08 de percentagem de células positivamente marcadas Vs. 14, 53 de percentagem de células positivamente marcadas, respetivamente) comparado com o pavilhão auricular (6,58 de percentagem de células positivamente marcadas Vs. 5,28 de percentagem de células de positivamente marcadas, respetivamente). Os resultados indicam que os CCE do plano nasal apresentam um comportamento infiltrativo mais agressivo na região da frente invasora do que os seus homólogos do pavilhão auricular (Gráfico 1). Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas para as outras variáveis estudadas.

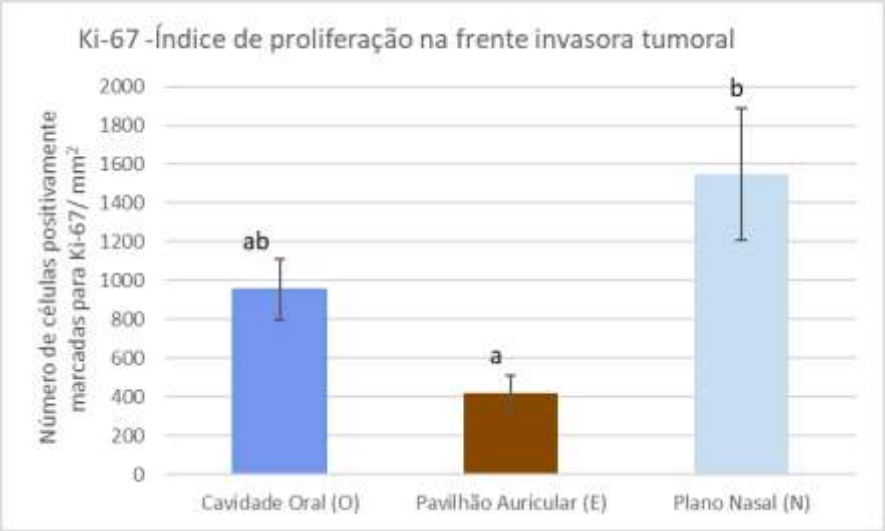


Gráfico 1 - Índice de proliferação de Ki-67 na frente invasora tumoral, da cavidade oral (O), pavilhão auricular (E) e plano nasal (N), de CCE em gatos. As barras representam média ± s.e.m. Barras com letras diferentes diferem significativamente ($p<0,05$).

4. Discussão

4.1 Estudo da homogeneidade da marcação intratumoral de Ki-67 em CCE em gatos

A estudo da homogeneidade da marcação de Ki-67 em carcinomas de células escamosas (CCE) em gatos, e consequentemente do índice de proliferação celular, serve o duplo propósito de investigar a facilidade de análise deste índice pelas técnicas de histopatologia e de tentar compreender o comportamento biológico deste tipo de tumor.

O estudo estatístico realizado visou comparar três contagens de marcação de Ki-67 obtidas de áreas aleatórias de um mesmo tumor, não tendo em conta a localização anatómica do mesmo. Os resultados demonstraram que não existem diferenças nas contagens entre diferentes zonas de um mesmo tumor.

De seguida realizou-se a comparação dos valores de cada contagem aleatória dentro do mesmo tumor com o valor médio das contagens da lâmina correspondente e conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas, evidenciando uma homogeneidade no estado de proliferação celular tumoral nas amostras avaliadas.

Adicionalmente, foi necessário verificar se há valores de confusão a influenciar os resultados, nomeadamente o número de células tumorais contadas e o número de células positivamente marcadas por área. De acordo com a análise de modelos multivariados, as

variáveis acima descritas não são consideradas fatores de confusão e, como tal, não têm influência nos resultados obtidos, pelo que a contagem se torna robusta independentemente do número de células que chega à análise histopatológica.

As principais conclusões desta etapa do estudo são a existência de homogeneidade de marcação de Ki-67 intratumoral, de forma a que a contagem de células positivamente marcadas não varia significativamente entre si. Adicionalmente, não existem diferenças relevantes entre as contagens aleatórias intratumorais e a média total das contagens. Como tal, durante o estudo da marcação de Ki-67 em CCE em gatos o operador não necessita de fazer várias contagens dentro de um mesmo tumor, sendo a seleção de uma área de células tumorais marcadas com Ki-67 e a sua contagem sequente representativa da marcação deste biomarcador no restante tumor.

Uma questão importante desta secção do estudo é referente a se o Ki-67 pode ser utilizado como indicador de heterogeneidade intratumoral.

Os tumores malignos são constituídos por grupos de células que se dispõem em sistemas complexos e dinâmicos, com propriedades histológicas, celulares e moleculares variadas (Michor & Polyak, 2010). Quando diferenças nestas propriedades são identificadas intratumoral (dentro do mesmo tumor) e/ou intertumoral (entre tumores), é indicativo da presença de heterogeneidade tumoral. A heterogeneidade intertumoral tem sido amplamente estudada, enquanto a intratumoral apresenta, comparativamente, escassa quantidade de informação associada (Inda, Bonavia & Seoane, 2014). As diferenças intratumorais remetem a parâmetros que são inerentes a células individuais ou a populações celulares que compõem o tumor, sejam elas fenotípicas ou genéticas (Gerashchenko *et al*., 2013; Michor & Polyak, 2010).

Quando a estrutura morfológica, as expressões genéticas e interações epigenéticas se formam e ocorrem de modo não uniforme dentro de um mesmo tumor, é esperada a consequente variabilidade de expressão de biomarcadores por diferentes grupos celulares, ou seja, a heterogeneidade intratumoral (Inda *et al.,* 2014) (Figura A7). Esta, por sua vez, aparenta ter origem multifatorial. Deve-se à ocorrência de alterações genéticas e epigenéticas nas células tumorais, sob a influência do microambiente tumoral e/ou das interações de ambos (Inda *et al*., 2014). Como tal, esta heterogeneidade pode ser hereditária ou adquirida (Tabassum & Polyak, 2015). O desenvolvimento de heterogeneidade intratumoral é, possivelmente, uma estratégia adaptativa das células neoplásicas perante alterações do microambiente que as rodeiam e/ou um mecanismo para alterar o seu potencial maligno. Esta capacidade intrínseca do tumor suscita a formação de grupos clonares com características diferentes, dentro do mesmo tumor (Fisher, Pusztai & Swanton, 2013).

A heterogeneidade tumoral é considerada geracional. Cada geração de clones tumorais apresenta variações pré-existentes, com acumulação de características diferentes, tornando o tumor cada vez mais dinâmico. Um dos principais mecanismos envolvido na heterogeneidade geracional é o desenvolvimento de um "fenótipo mutador". Este forma-se segundo alterações cromossomais das células neoplásicas e é responsável pela instabilidade genómica, desenvolvimento e acumulações de mutações. Pode dizer-se que o "fenótipo mutador" tem origem na heterogeneidade intratumoral e, simultaneamente, ajuda a propagar a mesma (Ng, Pemberton & Reis-Filho, 2012; Bielas, Loeb, Rubin, True & Loeb, 2006).

Várias teorias para o desenvolvimento do cancro consideram o tecido tumoral original monoclonal, isto é, a origem do cancro está em eventos carcinogénicos cumulativos numa única célula que, consequentemente, se multiplica consecutivamente para dar origem à massa tumoral. No entanto, esta célula inicial não apresenta todas as características de cancro previamente enunciadas, não tendo potencial para formar populações celulares totalmente malignas. À medida que se dividem, estas células vão acumulando mutações genéticas variadas. As alterações na replicação do ADN acabarão por dar origem a células geneticamente diferentes entre si, ou seja, subclones. A maioria das teorias propõem que os subclones se dividem indefinidamente e evoluem de modo independente, até uma célula subclonal adquirir todas as características do cancro e, finalmente, dar origem a uma população totalmente maligna. São estes grupos de subclones, genética e fenotipicamente distintos, que formam a heterogeneidade tumoral (Axelrod, Axelrod & Pienta, 2006). Enquanto está previsto que estas populações "filhas" evoluam independentemente, através da competição por recursos como oxigénio, nutrientes e espaço, Axelrod & Pienta (2006) teorizam que existe, na verdade, cooperação entre as células com repercussões positivas na progressão tumoral. Quando células diferentes partilham recursos que são exclusivos de umas, mas requisitados por outras, a capacidade cumulativa de mutações torna-se mais rápida. Como os tumores são heterogéneos, as populações apresentam propriedades diferentes e através desta cooperação torna-se mais provável que pelo menos um dos subclones adquira todas as mutações necessárias para se tornar capaz de metastizar e formar novas massas à distância. Isto é, a heterogeneidade tumoral e a cooperação entre comunidades diferentes torna o tumor mais agressivo. Há uma correlação positiva entre heterogeneidade e agressividade. A teoria que atualmente contempla estas diferenças compara o sistema tumoral a uma árvore, classificando as mutações como pertencentes ao tronco quando se encontram na população de origem, isto é, os clones celulares ou como ramos quando presentes nos subclones (e tal como os ramos se dispersam entre si, também os subclones apresentam mutações próprias) (Marusyk & Polyak, 2010; Yap, Gerlinger, Futreal, Pusztai & Swanton, 2012).

A heterogeneidade intratumoral, entre outras complicações, influencia negativamente o diagnóstico de cancros, apesar de a mesma poder ser classificada como um importante marcador clínico da malignidade tumoral (Gerashchenko *et al*., 2013).

Estudo genómicos realizados em humanos, concluíram a existência de uma importante heterogeneidade intratumoral em CCE na cabeça, pescoço e cavidade oral (Canning *et al.*, 2019; Zandberg e*t al.*, 2019), sendo que os CCE humanos são considerados como tendo diferentes graus de diferenciação dentro de um mesmo tumor (Rivera, 2015). Ramón Y Cajal *et al*. (2020) afirma ser espectável a identificação coexistente de regiões bem, moderadamente e mal diferenciadas em CCE.

Estudos genómicos como os de Rodney *et al.*, (2023) em CCE orais em gatos, comprovam a existência de heterogeneidade intratumoral, bem como semelhanças em mutações especificas entre gatos e humanos, ou seja, os genes e mecanismos que perpelam a tumorgénese em CCE oral são semelhantes entre as duas espécies.

Estudos como o de Sharma *et al*. (2019) em CCE pulmonar humano, salientam que diferenças regionais intratumorais, não apenas de origem genética, mas também fenotípica, têm uma importante influência na conformação clonal das massas tumorais.

Em medicina veterinária, são escassos os projetos que se focam na heterogeneidade intratumoral, genotipica ou fenotípica.

Logicamente, sendo cada tumor um sistema complexo com arquitetura clonal variada, com comunidades celulares com características e comportamentos distintos, também a expressão de biomarcadores será afetada pela heterogeneidade intratumoral (Swanton, 2012). O Ki-67 permite o estudo do índice de proliferação tumoral, diretamente associado à capacidade de proliferação descontrolada, uma das características centrais do cancro. Geralmente, quando se realiza a medição deste valor, o tecido utilizado provém de uma única colheita/biópsia. Como tal, os valores resultantes são considerados representativos de todo o tumor, não valorizando a heterogeneidade inerente ao mesmo (Kock Am Brink e*t al*., 2023). Adicionalmente, foi confirmado por Yang, Tang & Klimstra (2011) que a atividade proliferativa das células neoplásicas é heterogénea.

O estudo de Böger, Behrens & Röcken (2016) focou-se na expressão de Ki-67 em carcinomas gástricos humanos tendo em consideração a heterogeneidade tumoral, com medição da marcação do biomarcador Ki-67 em diferentes locais do tumor, tal como no presente estudo. Os autores identificaram padrões de expressão heterogéneos aquando de avaliação de comunidades clonais diferentes.

O Ki-67 pode ser utilizado não só como fator de prognóstico por estar correlacionado ao índice de proliferação celular, mas também tem sido estudado como um medidor de heterogeneidade intratumoral, uma vez que esta influencia a eficácia dos tratamentos

selecionados, visto que grupos clonais e subclonais podem ser mais sensíveis que outros a um mesmo fármaco e/ou um grupo celular pode ser eliminado, dando espaço para o crescimento das comunidades resistentes (Boros *et al*., 2017).

O estudo de Jie, Bai, Yan, Chi & Li (2021), em CCE humano, não identificou diferenças significativa perante a comparação de um grupo cujas amostras foram recolhidas segundo protocolos de rotina e um grupo onde se realizou colheita de tecido tumoral em múltiplas zonas, de modo a ter uma amostra representativa. Contudo, identificaram diferenças na média de marcação positiva de Ki-67 das amostras pertencentes ao grupo onde foram realizadas recolhas em várias zonas, o que os autores consideraram indicativo da influência da heterogeneidade intratumoral na expressão do Ki-67.

Nesta dissertação os CCE selecionados foram classificados quanto ao grau de malignidade/agressividade através do sistema Nagamine *et al*., (2017). Tendo-se verificado que os tumores selecionados neste trabalho são, na sua maioria, pouco agressivos (grau 1) e relativamente bem diferenciados. Esta poderá ser a razão pela qual o Ki-67 não se demonstrou um adequado biomarcador de heterogeneidade.

A heterogeneidade intratumoral apresenta uma vertente fenotípica, sendo que esta foi a única vertente considerada neste trabalho. A verdadeira avaliação da heterogeneidade não está completa sem um estudo genético. Teoriza-se que apesar de bastante agressivos localmente, e como tal com heterogeneidade elevada, a sua fraca capacidade para metastizar e relativa elevada diferenciação celular dos CCE em gatos, fazem com que esta heterogeneidade não se concretize numa alteração significativa da expressão de Ki-67.

4.2 Estudo da heterogeneidade da marcação de Ki-67 nas várias secções da lâmina de histopatologia de CCE em gatos

A avaliação da heterogeneidade dos vários tipos de tecido numa mesma lâmina permite perceber se a contagem automática realizada com o auxílio de *software* é robusta a seleções menos cuidadas da área a analisar. O objetivo desta análise pretende a averiguação de dois pontos: (1) a necessidade de recorte cuidadoso da área do tumor a avaliar (através de ferramentas digitais) e (2) a influência nas contagens da marcação de Ki-67 de outros elementos que contribuem para heterogeneidade intratumoral como o microambiente (explorado na secção 4.3).

De modo a realizar esta porção do estudo procedeu-se à comparação entre o valor médio de marcação de Ki-67 obtido pela seleção de áreas aleatórias que incluíram apenas células tumorais e o valor da “verdadeira aletaória”, um valor médio da marcação do Ki-67 em áreas aleatórias com inclusão de células tumorais, estromais e inflamatórias. Neste estudo,

concluiu-se que não existem diferenças significativas entre estes dois tipos de contagens. Foi, ainda, utilizado o modelo multivariado para averiguar a presença de viés de confusão, tendo-se concluído, à semelhança do que foi descrito acima, que o número de células contadas e a densidade de células não atuam como fatores de confusão.

Segundo Hamilton *et a*l., (2014) e Pantanowitz *et al.*, (2011), a patologia digital centra-se na digitalização de lâminas, de modo transferir o seu conteúdo para formato digital. De acordo com o *software* utilizado, os tecidos digitais podem ser estudados em várias vertentes, desde parâmetros abrangentes como a arquitetura tecidual, até fatores mais minuciosos como a morfometria nuclear. A sua importância destaca-se, particularmente, na análise imunohistoquímica e de fluorescência de biomarcadores. A utilização de inteligência artificial em patologia permite um aumento da exatidão e precisão quantitativas no estudo destes marcadores moleculares (Baxi, Edwards, Montalto & Saha, 2021). O processo homólogo realizado visualmente pelo patologista é moroso (contagem de pelo menos 500-1000 núcleos) e está suscetível a erro humano (Denkert, Budczies, Minckwitz, Winert, Loibl & Klauschen, 2015; Dowsett *et al*., 20211).

Um dos programas mais universalmente utilizados na patologia digital é o programa Fiji. Este é a atualização do programa ImagJ, desenvolvido especialmente para a análise de imagens biológicas (Schindelin *et al*., 2012). Para a utilização da função de contagem de células coradas através deste programa, o operador necessita apenas de uma imagem do tumor. Este programa não permite, contudo, o recorte da área desejada. A imagem utilizada pode conter apenas células tumorais se a ampliação for elevada, resultando em menor número de células presentes devido à aproximação. Se se optar por uma área maior para abranger mais células tumorais, inevitavelmente (e principalmente em tumores infiltrativos como o CCE) outros componentes do tecido serão incluídos na imagem (e consequentemente na contagem), tal como o estroma associado ao tumor e células inflamatórias nele infiltradas.

De modo a mimetizar a utilização do programa Fiji neste trabalho, selecionou-se uma região aleatória do tumor (utilizado uma função idêntica do QuPath) que contém não só células tumorais marcadas e não marcadas, mas também células estromais e células inflamatórias - a “verdadeira aleatória”. De seguida, foram realizadas contagens através do recorte cuidadoso de áreas aleatórias do tumor propriamente dito. Finalmente, os valores destes dois tipos de contagens foram comparados.

A conclusão retirada foi que as diferenças existentes dentro de um mesmo tumor não são estatisticamente significativas, ou seja, as contagens dos dois grupos não diferem significativamente entre si. Esta informação tem impacto no trabalho dos operadores que realizam este tipo de estudo. Apesar de as contagens realizadas através das ferramentas do QuPath serem indiscutivelmente mais fidedignas, pois remetem apenas às células tumorais

que são a área de interesse, não sendo necessário o trabalho adicional de selecionar meticulosamente áreas tumorais especificas, o estudo torna-se mais fácil e rápido, com resultados obtidos de modo eficiente e sem comprometimento da precisão dos mesmos. Contudo, é importante realizar-se comparações entre as interpretações realizadas por estes *softwares* e os próprios patologistas (Baxi *et al*., 2021).

4.3 Estudo comparativo da contagem de Ki-67 na massa tumoral e no estroma associado ao tumor em CCE em gatos

Cada lâmina de microscopia para análise histopatológica de um dado tumor é muitas vezes composta pelo tumor propriamente dito e zonas de estroma adjacente que pode, ou não, ter infiltração de células tumorais ou inflamatórias. Assim, torna-se importante do ponto de vista do estudo do comportamento do tumor no organismo, perceber se existe uma relação entre o índice de proliferação, no caso avaliado pela expressão da proteína Ki-67, das células tumorais e do estroma. Desta forma, foram selecionadas áreas da lâmina de forma completamente aleatória ("verdadeira aleatória") e regiões exclusivamente compostas por estroma, sendo as contagens da marcação de Ki-67 realizadas automaticamente.

A análise dos dados de contagens recolhidos permitiu verificar que existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de contagem de Ki-67 do estroma associado ao tumor e as contagens da região "verdadeira aleatória" sendo que o número de células contadas e a densidade de células positivas não atuaram como fatores de confusão na contagem de marcação de Ki-67 estromal.

Nesta etapa do estudo, foi possível confirmar a presença de heterogeneidade dos tecidos encontrados numa lâmina histológica e da influência de outros componentes (para além das células tumorais) na contagem da expressão de Ki-67 em CCE em gatos.

O microambiente de tumores malignos é ele próprio altamente heterogéneo. Este é composto, para além de células tumorais, por células estromais que o próprio tumor recruta para auxiliar no seu desenvolvimento e progressão. Os constituintes do microambiente a ser recrutados podem advir de tecido endógeno próximo ou de tecidos distantes através da circulação sistémica (Kidd *et al*., 2012). À medida que o tumor se desenvolve, as suas necessidades alteram-se e, como resposta, o estroma associado ao tumor modifica-se, podendo dizer-se que estes dois componentes do microambiente co-evoluem (Hanahan & Coussens, 2012). As células de suporte presentes no estroma associado ao tumor atuam de modo a promover e facilitar o desenvolvimento das "características do cancro". Hanahan & Ciussens (2012) afirmam que estas atuam ativamente na manutenção de sinalização proliferativa, evasão aos supressores de crescimento e à destruição pelo sistema imunitário,

indução de imortalidade replicativa, ativação do processo de invasão e metástase, indução da angiogénese, resistência à morte celular e desregulação dos mecanismos energéticos celulares. Como já mencionado, os tecidos neoplásicos atuam como feridas que nunca cicatrizam. Contudo, a formação do estroma associado ao tumor apresenta semelhanças com o tecido cicatricial (Dvorak, 1986). Durante a sua formação dá-se a alteração da matriz extracelular que envolve as células tumorais, com infiltração de fibroblastos e células do sistema imunitário associada a neovascularização. Através do recrutamento de células não tumorais com diferentes funções, tais como (e para além das já citadas) células estromais mesenquimais, adipócitos, macrófagos, células endoteliais e perícitos e até mesmo células da medula óssea, a massa tumoral é mantida e progride (Dvorak, 1986). O estudo de Scully *et al*. (2012) com foco num processo único denominado de transdiferenciação especificamente em células estaminais de glioblastomas, revela que as células tumorais apresentam capacidade para se modificarem, isto é, se transdiferenciarem em células do estroma associado ao tumor de modo a auxiliar na progressão tumoral. Tendo em conta a panóplia de células envolvidas e a capacidade de transdiferenciação celular (de tumoral para estromal e de estromal para tumoral), pode afirmar-se que o tumor (massa tumoral e microambiente) é um tecido altamente heterogéneo e dinâmico (Bussard, Mutkus, Stumpf, Gomez-Manzano & Marini, 2016). Um processo central na formação do estroma associado ao tumor designa-se de transformação de epitelial/endotelial a mesenquimal (TEM). Este processo complexo está no cerne da transformação de células endoteliais, fibroblastos, células imunes e estaminais, e mesmo células tumorais, em células estromais com capacidade de produção de fatores de crescimento, citoquinas e quimioquinas que estimulam a progressão e eventual metástase do tecido tumoral (Jayanthi, Varun & Selvaraj, 2020).

A interação entre células pertencentes ao estroma associado ao tumor e as células neoplásicas é considerada uma forma de comensalismo com impacto positivo na manutenção da massa tumoral e promoção do seu crescimento (Mueller & Fusenig,2004).

Yashiro, Ikeda, Tendo, Ishikawa & Hirakawa (2005), afirmam que estudos moleculares em células estromais identificaram diferenças consideráveis entre células pertencentes a estromas constituintes de tecidos sãos e estromas associados a tumores, nomeadamente carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Através da acumulação de mutações características de tecidos tumorais, as massas adquirem capacidade de ativar e modificar as células estromais, incitando processos como a produção de componentes da matriz extracelular, neoangionénese, resposta imune e inflamatória e proliferação de fibroblastos associados ao tumor (Beacham & Cukierman, 2005). A comunicação entre tumor e estroma realiza-se maioritariamente através de sinais parácrinos entre células estromais (nomeadamente, fibroblastos associados a carcinoma) e células epiteliais tumorais. Uma das principais

moléculas envolvidas nesta comunicação intercelular é a proteína de ativação de fibroblastos, presente na superfície celular dos mesmos. Segundo Cheng *et al*. (2002), a ativação desta proteína transmembranar estromal está associada a um grau de agressividade tumoral mais elevado e progressão neoplásica em murganhos.

Uma das vias de tratamento atuais em casos de neoplasias trata-se da indução de senescência celular em células tumorais. O estudo de Parrinello, Coppe, Krtolica & Campisi (2005) em carcinomas mamários em murganhos, verificou que a exposição do epitélio pré-maligno a fibroblastos senescentes associados ao carcinoma humano resulta numa perda irreversível das funções de diferenciação do epitélio, associada a uma total transição para tecido maligno com capacidade invasora. Tal comprova a influência de células estromais na carcinogénese, mesmo quando estas se apresentam aparentemente inativas (Bilalović, Vranić, Serdarević, & Foco, 2006).

O estudo de Klobukowska & Munday (2016) identificou uma correlação positiva entre valores elevados de fibroblastos associados ao tumor com menor tempo de sobrevivência, evidenciando o seu possível papel como fator de prognóstico em gatos com CCE.

Os métodos de classificação do grau de malignidade mais utilizados, como o sistema TNM, focam-se nas propriedades das células tumorais e ignoram o comportamento do estroma associado ao tumor. Para além da influência que este detém na progressão da doença, está comprovado que tumores com estroma abundante estão associados a maior malignidade e a pior sobrevivência, pelo que o rácio tumor-estroma começa a ser ponderado como um fator prognóstico (Kemi, Eskuri & Kauppila, 2019; Almangush *et al*, 2021). A revisão bibliográfica de Almangush *et al*. (2021) sobre CCE em humanos identificou evidência de que quantidades elevadas de estroma associado ao tumor apresentam correlação positiva com o grau de agressividade tumoral e sobrevivência reduzida.

Apesar da existência de diversos estudos sobre heterogeneidade e sobre marcação de Ki-67 em CCE, a informação sobre a distribuição espacial intratumoral deste biomarcador encontra-se sob debate (Reid, Balci, Saka & Adsay, 2014; Ricci e*t al.*, 2016).

O estudo de Jing *et al*. (2018) em CCE orais em humanos, focou-se na marcação de Ki-67 em células tumorais e em fibroblastos presentes no estroma associado ao tumor, tendo em conta a heterogeneidade tumoral. Os autores verificaram que a sua expressão nas células tumorais era consideravelmente superior às células estromais avaliadas, tal como no presente estudo. O estudo teve em conta, para além da heterogeneidade celular, também a heterogeneidade das várias regiões da lâmina, através do estudo da expressão de Ki-67 em ambos os tipos de células no centro do tumoral e na frente invasora. Os autores concluíram que as células tumorais apresentaram maior expressão no centro do tumor, enquanto as estromais manifestaram maior marcação na frente invasora.

À semelhança do estudo anterior, Batelja-Vuletic e*t al.* (2021) também estudaram a expressão de Ki-67 em células tumorais e do estroma em CCE orais em humanos e verificaram que a sua expressão era mais intensa nas células tumorais do que nas estromais, tal como no presente trabalho.

O estudo da importância do estroma associado ao tumor e as suas funções para a progressão maligna de variados tumores foca-se muitas vezes no papel dos fibroblastos associados ao tumor. O mesmo se verifica em estudos referentes à expressão do biomarcador Ki-67 estromal, pois estas células encontram-se em proliferação ativa durante a carcinogénese e o Ki-67 é um marcador de proliferação. Contudo, no presente estudo identificou-se que uma quantidade importante de células marcadas no estroma eram células inflamatórias.

A relação entre o tecido tumoral e o sistema imunitário é complexo. A presença de inflamação, principalmente no início da carcinogénese, apresenta benefícios para o organismo, uma vez que células como linfócitos *Natural Killer* e linfócitos T citotóxicos atuam ativamente de modo a destruir o tecido anormal e impedir o desenvolvimento de cancro (Garcia-Lora, Algarra & Garrido, 2003). Contudo, uma vez estabelecido, o tumor apresenta diversos mecanismos para impedir a sua deteção pelo sistema imunitário e, quando detetado, para impedir a sua ação anti-tumoral (Garcia-Lora *et al.,* 2003). A conversão do sistema imunitário está dependente da presença de outros componentes do estroma associado ao tumor, como os fibroblastos associados ao tumor que auxiliam na progressão tumoral através da produção de citoquinas pró-inflamatórias (Tlsty & Coussens, 2006), a presença de moléculas (citoquina, quimiocinas, etc.) e de interações tumorais específicas que impelem a transformação fenotípica das células de defesa para um fenótipo promotor de tumor (Ostrand-Rosenberg, 2008; Smith & Kang, 2013). De acordo com de Visser, Eichten & Coussens (2006), a presença de infiltrados inflamatórios ricos em linfócitos no estroma associado ao tumor e tecido tumoral está associado a melhor prognóstico, enquanto que a abundância em neutrófilos e macrófagos correlaciona-se a um pior prognóstico e/ou a angiogénese mais evidente.

No presente estudo, a identificação da marcação de Ki-67 nos infiltrados inflamatórios, nomeadamente em neutrófilos, foi um achado inesperado, sendo esta marcação por vezes mais evidente nas células inflamatórias que em células tumorais (Figura 3). Contudo, ao contrário de outros componentes do estroma associado ao tumor, esta células não se encontram tipicamente em proliferação ativa, logo não deveriam apresentar marcação de Ki-67.

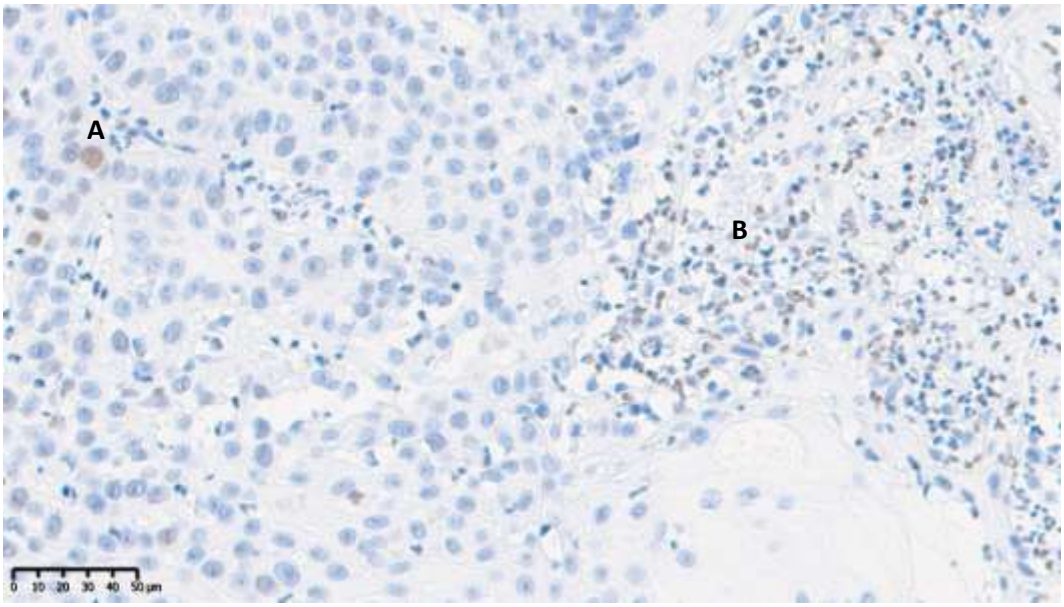


Figura 3 – Marcação de Ki-67 em células tumorais (**A**) e de neutrófilos (**B**), em CCE em gatos. Coloração com DAB e de contraste com hematoxilina de Mayer (objetiva 40x).

Os neutrófilos são células que alcançaram total diferenciação, não apresentado capacidade de divisão (Klaussen, Bjerregaard, Borregaard & Cowland, 2004). Estas têm origem na medula óssea e após a sua diferenciação e realização das suas funções como componente do sistema imune inato, sofrem necrose ou apoptose. Contudo, existe um desfecho adicional para estas células: a NETose (ou netose) é um tipo de morte celular dos neutrófilos associada à libertação de cromatina sob a forma de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Demers *et al*., 2012). Esta morte "alternativa" implica a destruição nuclear e de membranas granulares da célula, a libertação dos compostos para o citosol e a sua expulsão para o espaço extracelular após a rutura da membrana celular (Demers *et al*., 2012). Um aspeto particular da NETose, e que a diferencia da apoptose, é a ocorrência da desintegração do envelope nuclear que, coincidentemente, ocorre de forma idêntica durante a mitose. Perante estas evidências, Amulic *et al*. (2017), elaboraram a hipótese que a indução de NETose poderia estar associada a reativação mitogénica de certos reguladores do ciclo celular. Para que haja reativação é necessária a ação de mitogénios sobre recetores específicos, nomeadamente a proteína quinase ativada por mitogene. Estas moléculas regulam o ponto de controlo da fase G_1, sendo que a progressão ao longo das restantes fases é mitogene-independente (Alberts *et al*., 2002[b]). Os neutrófilos são considerados como residentes permanentes da fase G_0, contudo durante o estudo de Amulic *et al*., (2017) verificou-se que os neutrófilos provocam a ativação das quinases pertencentes à fase G_1 quando estimulados a fazer NETs. Um dos biomarcadores estudados por Amulic *et al.* (2017) trata-se do Ki-67. Os autores confirmaram que neutrófilos em quiescência não apresentavam

qualquer marcação, mas que os estimulados a entrar em NETose demonstram-se positivos para o Ki-67.

A NETose apresenta importância para o estudo do cancro, pois é estimulada perante defeitos no controlo do ciclo celular em tecidos tumorais mediante alterações das CDKs. A sua desregulação, seja porque o tumor se torna independente de mitogénios ou imune a agentes antimitogénicos, despoleta não só a proliferação descontrolada das células neoplásicas, bem como instabilidade genómica e cromossómica. Adicionalmente, das quinases envolvidas no ciclo celular, as proteínas homólogas CDK 4 e 6 são as principais reguladoras da transição da fase G_1 e G_2 (Malumbres & Barbacid, 2009). A atividade de mitogenes em células quiescentes com CDK 4 e 6 leva a reativação do ciclo celular (Tigan, Bellutti, Kollmann, Tebb & Sexl, 2016). Amulic *et al*., (2017), ao realizarem o estudo em neutrófilos humanos identificaram a presença de CDK 4 e 6 e que estas proteínas auxiliam na regulação da formação de NETs através da regulação do ciclo celular. Da mesma forma a elevada expressão da CDK 6 foi identificada em diferentes cancros de tal modo que a sua inibição poderá vir a fazer parte de terapias no futuro (Tigan, Bellutti, Kollmann, Tebb & Sexl, 2016).

Desta forma, poderá admitir-se que durante o presente estudo dos CCE selecionados estaria-se perante uma reativação mitogénica dos tecidos (não incomum em neoplasias) e que os neutrófilos que se encontravam a invadir o estroma associado ao tumor estariam, potencialmente, em NETose e como tal positivamente marcados para o Ki-67. A identificação de possível NETose em casos de cancro poderá ter importância, visto que está comprovado o seu papel na carcinogénese, seja porque promovem a libertação de moléculas pró-inflamatórias que resultam em danos no ADN, seja pela promoção de proliferação de células neoplásicas, levando a um microambiente propício à tumorgénese (He, Cao, Zhao, Li, Zhou & Hirsch, 2018 e Ortenberg, 2015 citados por Jaboury *et al*., 2023). Adicionalmente este fenómeno facilita a metástase do tecido tumoral de origem através de diferentes processos. Os neutrófilos localizados no estroma associado ao tumor libertam NETs com capacidade de prender fisicamente células tumorais e através de uma serino-protease, produzida também pelos neutrófilos, dá-se a síntese de fator de crescimento semelhantes à insulina-1. Estes últimos promovem o aumento de adesão intercelular mediada por E-caderinas com consequente agregação de células neoplásicas e a sua entrada na corrente sanguínea (He *et al.,* 2018 e Ortenberg, 2015 citados por Jaboury *et al*., 2023). Deste modo, a evidente abundância de neutrófilos no estroma associado ao tumor (Si *et al*., 2019) e em circulação (Sumner *et al*., 2017) são considerados como fatores de mau prognóstico em diversos cancros, incluindo cancros cutâneos como o CCE da cabeça e pescoço em humanos (Pylaeva *et al.,* 2022).

Interessantemente, neste trabalho, o local anatómico onde os tumores apresentaram aparentemente maior inflamação, associada a elevada marcação de Ki-67 estromal e de uma forma geral no tumor (considerando a contagem “verdadeira aleatória”) trata-se da cavidade oral. O CCE oral é a neoplasia oral mais comum em gatos, representando 70-80% dos tumores orais. O prognóstico deste tipo de tumores não é favorável devido ao diagnóstico frequentemente tardio da doença (Bilgic, Duda, Sánchez & Lewis, 2015). A cavidade oral é revestida por um epitélio escamoso não queratinizado e, como tal, mais frágil. Adicionalmente, apresenta um microbioma específico, está exposto a agentes ambientais exógenos (incluindo carcinogéneos) e é local de respostas imunes inatas e adquiridas bem desenvolvidas (Dewhirst *et al*., 2010). Geralmente, o CCE oral em humanos encontra-se notoriamente associado a infiltração inflamatória (Laliberté *et al*., 2021), sendo que o estudo de Goertzen *et al.,* (2018) identificou cinco vezes mais células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) em amostras de tecido oral de doentes com CCE e dez vezes mais citoquinas pró-inflamatórias na saliva dos mesmos, em comparação com controlos saudáveis. Estes autores conseguiram assim concluir que a presença da elevada inflamação promove a invasão do tecido tumoral em casos de CCE oral humano. O estudo de Renzi *et al*. (2020) identificou alterações na metilação do ADN em genes específicos de gatos com CCE oral associadas a elevada percentagem de mutações no gene TP53 (68% dos gatos com CCE oral) em comparação com felinos com mucosa saudável (3%). Apesar de em quantidades mais reduzidas, as mesmas alterações foram identificadas em gatos com estomatite, o que permite formar uma correlação com inflamação oral e, quando esta é crónica, com o desenvolvimento e a progressão do CCE oral.

4.4 Marcação de Ki-67 na frente invasora e na superfície de CCE em gatos

A análise estatística revelou que a proliferação, evidenciada pela marcação do Ki-67, era estatisticamente semelhante entre a frente invasora e a superfície do tumor. Adicionalmente, não foram detetadas diferenças na proliferação das células tumorais especificamente da frente invasora e as realizadas no centro do tumor (contagens aleatórias). No entanto, observou-se que os CCE do plano nasal apresentavam comportamentos infiltrativos mais agressivos na frente invasora do tumor em comparação com o pavilhão auricular, considerando o maior estado proliferativo das suas células.

Referente à hipótese de utilização da frente invasora de tumores como fator prognóstico, Bryne (1998) constatou, considerando informação adquirida por diversos patologistas ao longo de décadas, que a morfologia da frente invasora tumoral é distinta de regiões superficiais e mesmo de áreas centrais de um mesmo tumor. A sua distinção consiste

numa maior dissociação e menor grau de diferenciação celulares quando comparadas as três regiões tumorais. Também as interações entre o tecido neoplásico da frente invasora e o microambiente que a envolve apresentam uma influência significativa no desenvolvimento e progressão tumoral. Os principais tumores onde essas diferenças foram identificadas foram os CCE, diversos adenocarcinomas e melanomas malignos. Bryne sugere que as diferenças, inter e intratumorais das células tumorais da frente invasora poderão ser as principais fornecedoras de informação para um correto prognóstico quando estudadas sistematicamente.

Histologicamente, estas células tumorais apresentam-se menos diferenciadas e com padrões de invasão mais marcados quando comparadas com as células de um mesmo tumor no centro ou superfície, em CCE orais e cutâneos em cães. Estas diferenças intratumorais são mais evidentes em tumores orais do que cutâneos (Nagamine *et al*., 2017).

A frente invasora de um tumor refere-se essencialmente à área tumoral que invade ativamente os tecidos envolventes, ou seja, a interface entre o tecido tumoral e o "hospedeiro" (Bryne *et al.,* 1998). Objetivamente, a frente invasora corresponde a entre três e seis camadas celulares do tumor e grupos celulares destacados da massa principal mais afastados da superfície (Piffkò *et al.,* 1997).

Como já comentado por Bryne (1998), as interações entre células tumorais e o espaço extracelular do "hospedeiro" são de significante importância.

O estroma corresponde ao espaço extracelular composto principalmente por água, componentes fibrosos como colagénio e fibras elásticas, glicoproteínas e proteoglicanos (Agrawal, Rai & Jain, 2011). Este, quando saudável, atua como uma barreira natural à progressão tumoral, através de estruturas compostas por colagénio ou por tecido muscular estriado ou liso (Devendra, Niranjan, Swetha & Kaver, 2018). No entanto, quando modificado auxilia na progressão da frente invasora através de suprimento sanguíneo (nutrição) e influxo de células inflamatórias. A sua função estrutural permite a manutenção da integridade tumoral, com o colagénio a suportar o tumor como se de um exoesqueleto se tratasse, atuando simultaneamente como barreira à sua progressão (Kalele *et al.,* 2014). De acordo com os estudos de Kalele *et al*., (2014), Venigella, Charu, Rao & Rao (2010) e Sharma *et al.,* (2015), a estrutura do estroma modifica-se e restrutura-se com a evolução e invasão do tumor. Em casos de CCE orais humanos bem diferenciados, o colagénio que o constitui adota a forma de grossas bandas. Em tumores com frentes invasoras mal diferenciadas as fibras de colagénio são finas, desorganizadas e laxas. As progressivas alterações do colagénio estromal podem ser utilizadas como fator de prognóstico, pois relacionam-se com a propensão das células tumorais de metastizar (Devendra *et al.,* 2018). Segundo, Agrawal *et al.,* (2011) os componentes fibrosos do estroma associam-se com a ocorrência de CCE oral

em humanos e alterações do padrão das fibras estromais foi identificado igualmente em cancros cutâneos (Stenback *et al*.,1999).

A maior proximidade da frente invasora com células inflamatórias infiltradas e, como tal, com as moléculas por estas libertadas fazem com que esta região esteja mais propensa a invadir em profundidade e eventualmente metastizar com maior facilidade (Sanegre *et al.,*2021).

Alterações moleculares na interface tumor-estroma viabilizam a progressão do tumor sendo que oscilações da expressão de proteínas da membrana basal estão envolvidas no processo de carcinogénese ao nível da frente invasora. Muitas destas proteínas (laminina, tenascina, fibronectina, contractina, E-caderinas, etc.) são produzidas pelas células tumorais da frente invasora com impacto na adesão celular (Wilson, Jiang, Pierce & Wiebkin, 1999; Sharma, Sah, Sharma & Radhakrishnan, 2013).

A capacidade invasora é complexa com vários intervenientes. Nomeadamente, para que haja espaço para que se dê a disseminação neoplásica é necessário ocorrer a degradação proteolítica da matriz extracelular. A elevada atividade de diferentes proteases é particularmente evidente na frente invasora e associada ao microambiente tumoral, não sendo considerada uma propriedade inerente das células cancerígenas (Hadler-Olsen, 2011; Kurahara *et al.,* 1999). Contudo, é necessária a presença de disfunção dos inibidores teciduais de metaloproteínases da matriz para uma invasão eficiente da frente tumoral (Ondruschka *et al.,* 2002).

Alterações inerentes às células tumorais pertencentes à frente invasora também contribuem para a sua malignidade, não sendo o estroma associado ao tumor e a interação tumor-estroma os únicos responsáveis pela facilidade da metastização. Alterações ao nível do ADN celular na frente invasora, em concordância com a história clínica dos doentes (tipo de tumor e estadio) são importantes fatores de prognóstico (Noguchi, Kinjyo, Kohama & Nakamori, 2002). Alterações como perda de heterozigotia e desequilíbrios ao nível dos alelos foram previamente identificados em CCE oral humano (Partridge et *al.,* 1999; Yamamoto *et al.,* 2003). Em adição, Tang, Xu & Zhou (2010) constatou que quanto maior a incidência destas mutações, maior a anaplasia celular da frente invasora. Por fim, foi confirmada elevada atividade proliferativa das células tumorais devido a um aumento na quantidade de moléculas estimuladoras de proliferação na frente invasora, quando comparando com outras áreas de um mesmo tumor (Sharma, Sah, Sharma & Radhakrishnan, 2013; Tumuluri, Thomas & Fraser, 2004). Existe uma correlação positiva entre a intensidade da proliferação tumoral (determinada pela contagem de células marcadas com Ki-67) na frente invasora com o estadio e a espessura do tumor, em CCE oral humano (Tumuluri *et al.,* 2004).

Todos os estudos abaixo descritos foram estudados em CCE oral e cutâneo em humanos.

O estudo de Kurokawa *et al.,* (2005) sobre a expressão de Ki-67 na frente invasora identificou uma correlação significativamente positiva entre um elevado índice de Ki-67 e evidente malignidade na frente invasora. O estudo de Myoung *et al.,* (2006) alcançou a mesma conclusão, tendo ainda identificado um índice de Ki-67 superior em doentes com metástases do tumor primário confirmadas. O estudo de Dissanayake, Jonson & Warnakulasuriya (2003), ao comparar o índice de Ki-67 do centro e da frente invasora, identificou um valor significativamente superior nesta última, revelando a capacidade proliferativa do tumor e a importância do estudo comparativo entre regiões de modo a obter informação sobre o caráter maligno do tumor. Tumuluri *et al.,* (2004), conseguiram correlacionar positivamente diferentes fatores de risco, como estadio clínico e a espessura do tumor, com elevados índices de Ki-67 na frente invasora, sendo que estes índices são consideravelmente mais evidentes em doentes com metástases à distância. No estudo de Jing *et al.*, (2018) realizou-se uma investigação idêntica aos estudos acima descritos, mas o índice de marcação de Ki-67 foi avaliado nos fibroblastos do estroma associados ao tumor da zona de interface estroma-frente invasora do tumor. Os autores concluíram que existe uma correlação positiva entre a expressão de Ki-67 no estroma da frente invasora com a progressão do tumor e prognóstico. Por outro lado, existem estudos como o de Cortegoso *et al.,* (2017) onde não se identificou uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de Ki-67 na frente invasora e a presença de metástases e, consequentemente, com o valor prognóstico deste biomarcador.

Tendo em conta o conjunto de propriedades inerentes às células tumorais da frente invasora, das células estromais que contactam com a frente invasora e às complexas e dinâmicas interações tumor-estroma, fica assim comprovada a importância desta área especifica da neoplasia para o prognóstico do doente, visto que se coloca a hipótese de que o verdadeiro comportamento do tumor só consegue ser determinado aquando do estudo da frente invasora (Dissanayake, 2017). Deste modo, os clínicos são aconselhados a planear biópsias com dimensões suficientes para incluir a frente invasora e permitir aos patologistas avaliar esta região histologicamente (Bryne, 1998).

4.5 Estudo da influência das variáveis sexo, idade, localização anatómica e grau de agressividade sobre a marcação de Ki-67

Uma vez que a maioria dos tumores foi classificada como bem diferenciados, ou seja, pertencentes ao grau 1 do sistema adaptado de Nagamine *et al.,* (2017), as 25 amostras foram

estudadas como um conjunto, tendo sido priorizada a sua divisão de acordo com a localização anatómica.

Segundo os testes estatísticos utilizados, não existe correlação estatística entre a idade dos gatos avaliados e a localização anatómica dos CCE e o grau de agressividade tumoral. Surpreendentemente, também o grau de agressividade não demostrou estar correlacionado com a localização anatómica dos CCE, embora estudos acima mencionados relatem que CCE da cavidade oral apresentam uma maior inflamação, que por sua vez é considerada um fator de mau prognóstico e maior malignidade (Goertzen *et al.,* 2018). No presente estudo, apenas foi identificada uma correlação com o sexo dos animais, sendo que os tumores do pavilhão auricular aparentam ser mais frequentes em fêmeas e os do plano nasal em machos, enquanto os da cavidade oral foram identificados igualmente em ambos os sexos. Contudo devido ao reduzido número de amostras estes resultados não foram considerados como biologicamente relevantes e deverão ser comprovados com a continuação destas análises em mais CCE em gatos. O sexo não influenciou a idade com que os tumores se desenvolvem.

4.6 Limitações do estudo

4.6.1 Impossibilidade de obter follow-ups

Aquando do planeamento deste projeto, no inicio de 2019, pretendia-se um estudo da expressão de Ki-67 e a comparação dos resultados com follow-ups clínicos dos casos avaliados de modo a, tal como muitos outros estudos, adquirir informação sobre o valor prognóstico deste biomarcador em CCE em gatos. Contudo, devido à pandemia muitos dos follow-ups foram perdidos devido à falência de clínicas e à incapacidade dos tutores trazerem os seus animais para tratamento, seja por motivos financeiros ou pelas regras que restringiram o movimento dos pessoas instituídas durante o período de tempo de quarentena. Como tal, embora uma importante parte do estudo não tenha sido conseguida com sucesso, a autora gostaria de realizar, no futuro, uma continuação do presente projeto de modo a alcançar esse objetivo.

4.6.2 Reduzido número de amostras

Inicialmente o projeto contava com quase 80 casos diferentes de gatos afetados com CCE. Infelizmente, devido a condicionantes de logística, os blocos foram perdidos. Por este motivo, foi possível realizar o estudo apenas com 25 casos de CCE, sendo que a esmagadora maioria apresentava o mesmo grau de agressividade. O número reduzido de amostras limita

as conclusões que podem ser retiradas, uma vez que o seu pequeno tamanho torna a amostra pouco representativa da população em estudo.

4.6.3 Utilização de programas digitais para análise de imagem

Como explorado no métodos e materiais, a utilização de inteligência artificial tem claros beneficios. Contudo, sabe-se que devido à menor precisão e especificidade dos métodos de avaliação automáticos em comparação com os visuais, é possível que os mesmos identifiquem marcação de Ki-67 em células não tumorais o que pode resultar numa sobrestimação dos valores obtidos (Abubakar *et al.*, 2016). A incorreta identificação de células marcadas pode dever-se a contornos celulares mal definidos, marcações com diferentes tonalidades e a própria heterogeneidade tumoral (Li, Han, Yu, Li & Liu, 2022). Seria interessante um estudo futuro em CCE de gatos em que se realize a comparação entre contagens visuais e contagens automáticas e entre contagens automáticas com e sem "aprendizagem" do programa especifico.

5. Conclusão

No presente estudo, duas componentes foram avaliadas de modo a retirar conclusões sobre a técnica de contagem automática e, simultaneamente, a heterogeneidade intratumoral de carcinomas das células escamosas em gatos. Ao comparar três contagens de localização aleatória dentro do tumor com inclusão de apenas células tumorais e entre cada uma destas contagens com o valor médio de marcação, comprovou-se homogeneidade intratumoral em capacidade proliferativa. Estas informações, em conjunto, revelam que para a realização do estudo da marcação de Ki-67 a localização da zona a analisar poderá ser aleatória e que não é necessário a realização de mais do que uma contagem.

Ao comparar o valor médio de marcação de Ki-67 (adquirido através da seleção e recorte áreas do tumor com apenas células tumorais com evidente marcação) e o valor de uma contagem que inclua aleatoriamente células tumorais, estromais e inflamatórias ("verdadeira aleatória") confirmou-se assim que os tumores analisados apresentam homogeneidade intratumoral. Deste modo, aquando do estudo deste tipo de tumores os operados não precisam de ter o trabalho adicional de selecionar e recortar a área pretendida, reduzindo consideravelmente o tempo dispensado neste tipo de trabalho. Adicionalmente, as células inflamatórias, apesar de marcadas positivamente para esta proteína, não aparentaram influenciar com relevância estas contagens, embora o seu estudo seja importante para o prognóstico final.

A heterogeneidade intratumoral foi estudada mais profundamente através da comparação das contagens da marcação do Ki-67 em regiões especificas da lâmina histológica. A comparação dos valores obtidos em locais aleatórios dentro do mesmo tumor e do estroma associado ao tumor demosntram uma diferença estatisticamente relevante, sendo a expressão de Ki-67 estromal bastante inferior, não sendo aconselhável a sua utilização como fator de prognóstico.

A marcação estromal foi particularmente evidente nas células inflamatórias, como neutrófilos. O estudo comparativo entre a marcação positiva de Ki-67 em células da superfície do tumor e da frente invasora demonstraram que não existem diferenças significativas entre estas duas regiões distintas e como tal, não foi possível confirmar a superior proliferação celular na frente invasora e o seu potencial como fator prognóstico em CCE em gatos. Neste estudo, a frente invasora não foi confirmada como a área mais importante para avaliação da malignidade do tumor. Contudo, os tumores do plano nasal aparentaram padrões de invasão mais agressivos ao nível da frente invasora em comparação com os tumores do pavilhão auricular.

O grau de agressividade dos tumores não se correlaciona estatisticamente com a idade, o sexo dos animais ou com a localização anatómica dos tumores. No entanto, verificou-se que na população em estudo os tumores do pavilhão auricular eram mais frequentes em fêmeas e os do plano nasal em machos, enquanto os da cavidade oral foram identificados igualmente em ambos os sexos.

Em nenhum momento do estudo os possíveis fatores de confusão “número de células” e “densidade celular” influenciaram os valores adquiridos, pelo que o operador poderá realizar este estudo sem haver cuidados acrescidos relacionado com a quantidade de células ou com o tamanho da área a selecionar.

Por fim, de modo a fortalecer estas conclusões serão necessários estudos futuros com o aprimoramento de certos aspetos como: seleção e análise de um maior número de casos de CCE, com o objetivo de obter um conjunto de amostras representativo da população em estudo; a investigação de diferentes regiões anatómicas com recurso aos mesmo métodos de modo a estudar mais profundamente a heterogeneidade intertumoral; e complementar a informação obtida sobre a proliferação tumoral através da expressão de Ki-67 com dados de follow-up dos casos selecionados (metastização, tempo de sobrevivência, recorrências e sucesso terapêutico).

Referências Bibliográficas

Abubakar, M., Orr, N., Daley, F., Coulson, P., Ali, H. R., Blows, F…(2016). Prognostic value of automated KI67 scoring in breast cancer: a centralised evaluation of 8088 patients from 10 study groups. *Breast cancer research: BCR*, *18*(1), 104. https://doi.org/10.1186/s13058-016-0765-6

Agrawal, U., Rai, H., & Jain, A. K. (2011). Morphological and ultrastructural characteristics of extracellular matrix changes in oral squamous cell carcinoma. *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research*, *22*(1), 16–21. https://doi.org/10.4103/0970-9290.79968

Akhter, M., Hossain, S., Rahman, Q. B., & Molla, M. R. (2011). A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, *15*(2), 168–176. https://doi.org/10.4103/0973-029X.84485

[a]Alberts, B., Johnson, A., Lewis J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002). An Overview of the Cell Cycle. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/

[b]Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Martin, R., Roberts, K. & Wlater, P. (2002). Extracellular Control of Cell Division, Cell Growth, and Apoptosis. Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26877/

Almangush, A., Alabi, R.O., Troiano, G. Coletta, D.R., Salo, T., Pirinen, M., Makitie, A.A. & Leivo, I. (2021). Clinical significance of tumor-stroma ratio in head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **21**, 480. https://doi.org/10.1186/s12885-021-08222-8

Amulic, B., Knackstedt, S. L., Abu Abed, U., Deigendesch, N., Harbort, C. J., Caffrey, B. E… (2017). Cell-Cycle Proteins Control Production of Neutrophil Extracellular Traps. *Developmental cell*, *43*(4), 449–462.e5. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.10.013

Axelrod, R., Axelrod, D. E., & Pienta, K. J. (2006). Evolution of cooperation among tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(36), 13474–13479. https://doi.org/10.1073/pnas.0606053103

Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D… (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* **7**, 16878. https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5

Baxi, V., Edwards, R., Montalto, M., & Saha, S. (2022). Digital pathology and artificial intelligence in translational medicine and clinical practice. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *35*(1), 23–32. https://doi.org/10.1038/s41379-021-00919-2

Aze, A., & Maiorano, D. (2018). Recent advances in understanding DNA replication: cell type-specific adaptation of the DNA replication program. *F1000Research*, *7*, F1000 Faculty Rev-1351. https://doi.org/10.12688/f1000research.15408.1

Batelja-Vuletic, L., Tomasovic-Loncaric, C., Ceppi, M., Bruzzone, M., Fucic, A., Krstanac, K., & Boras Vucicevic, V. (2021). Comparison of Androgen Receptor, VEGF, HIF-1, Ki67 and MMP9 Expression between Non-Metastatic and Metastatic Stages in Stromal and Tumor Cells of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Life (Basel, Switzerland)*, *11*(4), 336. https://doi.org/10.3390/life11040336

Beacham, D. A., & Cukierman, E. (2005). Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Seminars in cancer biology*, *15*(5), 329–341. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.003

Beveridge, W. I., & Sobin, L. H. (1974). International histological classification of tumors of domestic animals. *Bulletin of the World Health Organization*, *50*(1-2), 1–142.

Bicharkjian, K. C., Olencki, T., Aasi, Z. M., Andersen, S. J., Biltzblau, R., Bowen, M. G… (2017). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Squamous Cell Skin Cancer, Version 2.2018. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*. Acedido em 9 de Junho 2023 em https://oncolife.com.ua/doc/nccn/Squamous_Cell_Skin_Cancer.pdf

Bielas, J. H., Loeb, K. R., Rubin, B. P., True, L. D., & Loeb, L. A. (2006). Human cancers express a mutator phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(48), 18238–18242. https://doi.org/10.1073/pnas.0607057103

Bilalović, N., Vranić, S., Serdarević, F., & Foco, F. (2006). The role of the stroma in carcinogenesis. *Bosnian journal of basic medical sciences*, *6*(1), 33–38. https://doi.org/10.17305/bjbms.2006.3207

Bilgic, O., Duda, L., Sánchez, M. D., & Lewis, J. R. (2015). Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical Manifestations and Literature Review. *Journal of veterinary dentistry*, *32*(1), 30–40. https://doi.org/10.1177/089875641503200104

Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *8*(2), 149–160. https://doi.org/10.1038/nrm2105

Böger, C., Behrens, H. M., & Röcken, C. (2016). Ki67--An unsuitable marker of gastric cancer prognosis unmasks intratumoral heterogeneity. *Journal of surgical oncology*, *113*(1), 46–54. https://doi.org/10.1002/jso.24104

Bonnett, B. N., Egenvall, A., Olson, P., & Hedhammar, A. (1997). Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *The Veterinary record*, *141*(2), 40–44. https://doi.org/10.1136/vr.141.2.40

Boros, M., Moncea, D., Moldovan, C., Podoleanu, C., Georgescu, R., & Stolnicu, S. (2017). Intratumoral Heterogeneity for Ki-67 Index in Invasive Breast Carcinoma: A Study on 131 Consecutive Cases. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, *25*(5), 338–340. https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000315

Brodey R. S. (1970). Canine and feline neoplasia. *Advances in veterinary science and comparative medicine*, *14*, 309–354.

Brønden, L. B., Flagstad, A., & Kristensen, A. T. (2007). Veterinary cancer registries in companion animal cancer: a review. *Veterinary and comparative oncology*, *5*(3), 133–144. https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00126.x

Bryan J. N. (2016). The Current State of Clinical Application of Serum Biomarkers for Canine Lymphoma. *Frontiers in veterinary science*, *3*, 87. https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00087

Bryne M. (1998). Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral diseases*, *4*(2), 70–77. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x

Bryne, M., Boysen, M., Alfsen, C. G., Abeler, V. M., Sudbø, J., Nesland, J. M., Kristensen, G. B., Piffko, J., & Bankfalvi, A. (1998). The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer research*, *18*(6B), 4757–4764.

Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., & Kjaerheim, A. (1992). Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology*, *166*(4), 375–381. https://doi.org/10.1002/path.1711660409

Bryne, M., Koppang, H. S., Lilleng, R., Stene, T., Bang, G., & Dabelsteen, E. (1989). New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, *18*(8), 432–437. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1989.tb01339.x

Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C., & Marini, F. C. (2016). Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast cancer research : BCR*, *18*(1), 84. https://doi.org/10.1186/s13058-016-0740-2

Canning, M., Guo, G., Yu, M., Myint, C., Groves, M. W., Byrd, J. K., & Cui, Y. (2019). Heterogeneity of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Immune Landscape and Its Impact on Immunotherapy. *Frontiers in cell and developmental biology*, *7*, 52. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00052

Carpenter, J.L., Andrews, L.K. & Holzworth, J. (1987). Tumors and tumor-like lesions. *Diseases of the cat: Medicine and surgery*. Holzworth, J.: WB Saunders, Philadephia.

Caruntu, A., Moraru, L., Lupu, M., Ciubotaru, D. A., Dumitrescu, M., Eftimie, L… (2021). Assessment of Histological Features in Squamous Cell Carcinoma Involving Head and Neck Skin and Mucosa. *Journal of clinical medicine*, *10*(11), 2343. https://doi.org/10.3390/jcm10112343

Cheng, J. D., Dunbrack, R. L., Jr, Valianou, M., Rogatko, A., Alpaugh, R. K., & Weiner, L. M. (2002). Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model. *Cancer research*, *62*(16), 4767–4772.

Corrêa, L. G.., Castro, C. C. de., Silva, L. M. C. da., n Rossato, A. D. P., Berselli, M., Grecco, F. B.., Guim, T. N., & Fernandes, C. G. (2021). Prognostic factors and their role in the histological classification of cutaneous squamous cell carcinoma. *Research, Society and Development*, *10*(6), e52010615837. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.15837

Cortegoso, A. V. B., Laureano, N. K., Silva, A. D. D., Danilevicz, C. K., Magnusson, A. S., Visioli, F., & Rados, P. V. (2017). Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *Journal of applied oral science: revista FOB*, *25*(3), 318–323. https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0238

Dawes, S. M., Tsai, S., Gittleman, H., Barnholtz-Sloan, J. S., & Bordeaux, J. S. (2016). Racial disparities in melanoma survival. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *75*(5), 983–991. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.06.006

de Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews. Cancer*, *6*(1), 24–37. https://doi.org/10.1038/nrc1782

Delgado, L., Brilhante-Simões, P., Garcez, F., Monteiro, L., Pires, I., & Prada, J. (2022). p-S6 as a Prognostic Biomarker in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Biomolecules*, *12*(7), 935. https://doi.org/10.3390/biom12070935

Demers, M., Krause, D. S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J. R., Fuchs, T. A., Scadden, D. T., & Wagner, D. D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(32), 13076–13081. https://doi.org/10.1073/pnas.1200419109

Denkert, C., Budczies, J., von Minckwitz, G., Wienert, S., Loibl, S., & Klauschen, F. (2015). Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *24 Suppl 2*, S67–S72. https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.017

Devendra, A., Niranjan, K. C., Swetha, A., & Kaveri, H. (2018). Histochemical analysis of collagen reorganization at the invasive front of oral squamous cell carcinoma tumors. *Journal of investigative and clinical dentistry*, *9*(1), 10.1111/jicd.12283. https://doi.org/10.1111/jicd.12283

Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C., Yu, W. H., Lakshmanan, A., & Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, *192*(19), 5002–5017. https://doi.org/10.1128/JB.00542-10

Didona, D., Paolino, G., Bottoni, U., & Cantisani, C. (2018). Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, *6*(1), 6. https://doi.org/10.3390/biomedicines6010006

Dissanayake U. (2017). Malignancy grading of invasive fronts of oral squamous cell carcinomas: Correlation with overall survival. *Translational Research in Oral Oncology*;2. doi:10.1177/2057178X17708874

Dissanayake, U., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, K. A. (2003). Comparison of cell proliferation in the centre and advancing fronts of oral squamous cell carcinomas using Ki-67 index. *Cell proliferation*, *36*(5), 255–264. https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00282.x

Dorn, C. R., Taylor, D. O., & Schneider, R. (1971). Sunlight exposure and risk of developing cutaneous and oral squamous cell carcinomas in white cats. *Journal of the National Cancer Institute*, *46*(5), 1073–1078.

Dorn, C. R., Taylor, D. O., Schneider, R., Hibbard, H. H., & Klauber, M. R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *Journal of the National Cancer Institute*, *40*(2), 307–318.

Dos Santos, A., Lamego, É. C., Eisenhardt, L. M., de Vargas, I., Flores, M. M., Fighera, R. A., & Kommers, G. D. (2023). Prevalence and anatomopathological characterization of cutaneous squamous cell carcinomas with regional and distant metastases in dogs and cats: 20 cases (1985-2020). *Veterinary and comparative oncology*, *21*(2), 291–301. https://doi.org/10.1111/vco.12887

Dowsett, M., Nielsen, T. O., A'Hern, R., Bartlett, J., Coombes, R. C., Cuzick, J., Ellis… International Ki-67 in Breast Cancer Working Group (2011). Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *Journal of the National Cancer Institute*, *103*(22), 1656–1664. https://doi.org/10.1093/jnci/djr393

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, *3*(11), 991–998. https://doi.org/10.1038/ni1102-991

Dvorak H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, *315*(26), 1650–1659. https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152606

Downs, N. J., Axelsen, T., Schouten, P., Igoe, D. P., Parisi, A. V., & Vanos, J. (2019). Biologically effective solar ultraviolet exposures and the potential skin cancer risk for individual gold medalists of the 2020 Tokyo Summer Olympic Games. *Temperature (Austin, Tex.)*, *7*(1), 89–108. https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1581427

Eichelberg, H., & Seine, R. (1996). Lebenserwartung und Todesursachen bei Hunden. I. Zur Situation bei Mischlingen und verschiedenen Rassehunden [Life expectancy and cause of death in dogs. I. The situation in mixed breeds and various dog breeds]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, *109*(8), 292–303.

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 35(4), 495–516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Estaller, A., Kessler, M., Wehrend, A., Hirschberger, J., & Neumann, S. (2022). Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. *Animals: an open access journal from MDPI*, *12*(10), 1263. https://doi.org/10.3390/ani12101263

Esteva, A., Kuprel, B., Novoa, R. A., Ko, J., Swetter, S. M., Blau, H. M., & Thrun, S. (2017). Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, *542*(7639), 115–118. https://doi.org/10.1038/nature21056

Esther, R. J., Lamps, L., & Schwartz, H. S. (1999). Marjolin ulcers: secondary carcinomas in chronic wounds. *Journal of the Southern Orthopaedic Association*, *8*(3), 181–187.

Fahradyan, A., Howell, A. C., Wolfswinkel, E. M., Tsuha, M., Sheth, P., & Wong, A. K. (2017). Updates on the Management of Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC). *Healthcare (Basel, Switzerland)*, *5*(4), 82. https://doi.org/10.3390/healthcare5040082

Fania, L., Didona, D., Di Pietro, F. R., Verkhovskaia, S., Morese, R., Paolino, G… (2021). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*, *9*(2), 171. https://doi.org/10.3390/biomedicines9020171

Favrot, C., Welle, M., Heimann, M., Godson, D. L., & Guscetti, F. (2009). Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. *Veterinary pathology*, *46*(1), 25–33. https://doi.org/10.1354/vp.46-1-25

Fearon E. R. (1997). Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *278*(5340), 1043–1050. https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1043

Fidler I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer*, *3*(6), 453–458. https://doi.org/10.1038/nrc1098

Fisher, R., Pusztai, L., & Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *British journal of cancer*, *108*(3), 479–485. https://doi.org/10.1038/bjc.2012.581

Flies, E. J., Mavoa, S., Zosky, G. R., Mantzioris, E., Williams, C., Eri, R., Brook, B. W., & Buettel, J. C. (2019). Urban-associated diseases: Candidate diseases, environmental risk factors, and a path forward. *Environment international*, *133*(Pt A), 105187. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105187

Garcia-Lora, A., Algarra, I., & Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology*, *195*(3), 346–355. https://doi.org/10.1002/jcp.10290

Gerashchenko, T. S., Denisov, E. V., Litviakov, N. V., Zavyalova, M. V., Vtorushin, S. V., Tsyganov, M. M., Perelmuter, V. M., & Cherdyntseva, N. V. (2013). Intratumor heterogeneity: nature and biological significance. *Biochemistry. Biokhimiia*, *78*(11), 1201–1215. https://doi.org/10.1134/S0006297913110011

Goertzen, C., Mahdi, H., Laliberte, C., Meirson, T., Eymael, D., Gil-Henn, H., & Magalhaes, M. (2018). Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. *Oncotarget*, *9*(49), 29047–29063. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25540

Green, A. C., & Olsen, C. M. (2017). Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. *The British journal of dermatology*, *177*(2), 373–381. https://doi.org/10.1111/bjd.15324

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025

Hadler-Olsen, E., Wetting, H. L., Ravuri, C., Omair, A., Rikardsen, O., Svineng, G... (2011). Organ specific regulation of tumour invasiveness and gelatinolytic activity at the invasive front. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, *47*(2), 305–315. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.09.006

Hamilton, P. W., Bankhead, P., Wang, Y., Hutchinson, R., Kieran, D., McArt, D. G., James, J., & Salto-Tellez, M. (2014). Digital pathology and image analysis in tissue biomarker research. *Methods (San Diego, Calif.)*, *70*(1), 59–73. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.06.015

Hammerman, P. S., Fox, C. J., & Thompson, C. B. (2004). Beginnings of a signal-transduction pathway for bioenergetic control of cell survival. *Trends in biochemical sciences*, *29*(11), 586–592. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.09.008

Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*, *21*(3), 309–322. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022

Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, *86*(3), 353–364. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80108-7

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hanahan, D. (2022) Hallmarks of cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery.* 12 (1): 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hauck, M. (2012). Tumors of the skin and subcutaneous tissues. *In* S. Withrow, D. Vail & R. Page (Eds.) *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5ªEd., pp. 305-320). Missouri: Elsevier.

He, Y., Cao, J., Zhao, C., Li, X., Zhou, C., & Hirsch, F. R. (2018). TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets and therapy*, *11*, 7005–7009. https://doi.org/10.2147/OTT.S170385

Huuhtanen, R. L., Blomqvist, C. P., Wiklund, T. A., Böhling, T. O., Virolainen, M. J., Tukiainen, E. J., Tribukait, B., & Andersson, L. C. (1999). Comparison of the Ki-67 score and S-phase fraction as prognostic variables in soft-tissue sarcoma. *British journal of cancer*, *79*(5-6), 945–951. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690151

Inda, M. M., Bonavia, R., & Seoane, J. (2014). Glioblastoma multiforme: a look inside its heterogeneous nature. *Cancers*, *6*(1), 226–239. https://doi.org/10.3390/cancers6010226

Jaboury, S., Wang, K., O'Sullivan, K. M., Ooi, J. D., & Ho, G. Y. (2023). NETosis as an oncologic therapeutic target: a mini review. *Frontiers in immunology*, *14*, 1170603. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1170603

Jayanthi, P., Varun, B. R., & Selvaraj, J. (2020). Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: An insight into molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, *24*(1), 189. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_334_19

Jie, W., Bai, J., Yan, J., Chi, Y., & Li, B. B. (2021). Multi-Site Tumour Sampling Improves the Detection of Intra-Tumour Heterogeneity in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in medicine*, *8*, 670305. https://doi.org/10.3389/fmed.2021.670305

Jing, Y., Yang, Y., Hao, F., Song, Y., Zhang, X., Zhang, Y…(2018). Higher Ki67 expression in fibroblast like cells at invasive front indicates better clinical outcomes in oral squamous cell

carcinoma patients. *Bioscience reports*, *38*(6), BSR20181271. https://doi.org/10.1042/BSR20181271

Kalele, K., Managoli, N.A., Roopa, N., Kulkarni, M.A., Bagul, N., & Kheur, S.M. (2014). Assessment of collagen fiber nature, spatial distribution, hue and its correlation with invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma and surgical margins using Picro Sirius red and polarized microscope. *Journal of Dental Research and Review, 1*, 14.

Kallini, J. R., Hamed, N., & Khachemoune, A. (2015). Squamous cell carcinoma of the skin: epidemiology, classification, management, and novel trends. *International journal of dermatology*, *54*(2), 130–140. https://doi.org/10.1111/ijd.12553

Kemi, N., Eskuri, M. & Kauppila, J.H. (2019) Tumour-stroma ratio and 5-year mortality in gastric adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* **9**, 16018. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52606-7

Kesarkar, K., Tamgadge, A., Peirera, T., Tamgadge, S., Gotmare, S., & Kamat, P. (2018). Evaluation of Mitotic Figures and Cellular and Nuclear Morphometry of Various Histopathological Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma: Comparative study using crystal violet and Feulgen stains. *Sultan Qaboos University medical journal*, *18*(2), e149–e154. https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.02.005

Khan, N. H., Mir, M., Qian, L., Baloch, M., Ali Khan, M. F., Rehman, A. U …(2021). Skin cancer biology and barriers to treatment: Recent applications of polymeric micro/nanostructures. *Journal of advanced research*, *36*, 223–247. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.014

Kidd, S., Spaeth, E., Watson, K., Burks, J., Lu, H., Klopp, A., Andreeff, M., & Marini, F. C. (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PloS one*, *7*(2), e30563. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030563

Klausen, P., Bjerregaard, M. D., Borregaard, N., & Cowland, J. B. (2004). End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. *Journal of leukocyte biology*, *75*(3), 569–578. https://doi.org/10.1189/jlb.1003474

Klobukowska H. J. & Munday J., S. (2016). High Numbers of Stromal Cancer-Associated Fibroblasts Are Associated with a Shorter Survival Time in Cats with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Pathology*. 53(6):1124-1130. doi:10.1177/0300985816629713

Kock Am Brink, M., Dunst, L. S., Behrens, H. M., Krüger, S., Becker, T., & Röcken, C. (2023). Intratumoral heterogeneity affects tumor regression and Ki67 proliferation index in perioperatively treated gastric carcinoma. *British journal of cancer*, *128*(2), 375–386. https://doi.org/10.1038/s41416-022-02047-3

Kossard, S., & Rosen, R. (1992). Cutaneous Bowen's disease. An analysis of 1001 cases according to age, sex, and site. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *27*(3), 406–410. https://doi.org/10.1016/0190-9622(92)70208-w

Kurahara, S., Shinohara, M., Ikebe, T., Nakamura, S., Beppu, M., Hiraki, A., Takeuchi, H., & Shirasuna, K. (1999). Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head & neck*, *21*(7), 627–638. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0347(199910)21:7<627::aid-hed7>3.0.co;2-2

Kurokawa, H., Zhang, M., Matsumoto, S., Yamashita, Y., Tanaka, T., Tomoyose, T…(2005). The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, *34*(10), 602–607. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2005.00358.x

Laliberté, C., Ng, N., Eymael, D., Higgins, K., Ali, A., Kiss, A., Bradley, G., & Magalhaes, M. A. O. (2021). Characterization of Oral Squamous Cell Carcinoma Associated Inflammation: A Pilot Study. *Frontiers in oral health*, *2*, 740469. https://doi.org/10.3389/froh.2021.740469

Li, L., Han, D., Yu, Y., Li, J., & Liu, Y. (2022). Artificial intelligence-assisted interpretation of Ki-67 expression and repeatability in breast cancer. *Diagnostic pathology*, *17*(1), 20. https://doi.org/10.1186/s13000-022-01196-6

Losquadro W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial plastic surgery clinics of North America*, *25*(3), 283–289. https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001

Lourenço, S. de Q. C.., Schueler, A. F.., Camisasca, D. R.., Lindenblatt, R. de C.., & Bernardo, V. G. . (2007). Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Revista Brasileira De Cancerologia*, *53*(3), 325–333. https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1800

MacVean, D. W., Monlux, A. W., Anderson, P. S., Jr, Silberg, S. L., & Roszel, J. F. (1978). Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Veterinary pathology*, *15*(6), 700–715. https://doi.org/10.1177/030098587801500602

Maley, C. C., Galipeau, P. C., Li, X., Sanchez, C. A., Paulson, T. G., & Reid, B. J. (2004). Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selecte. *In Barrett's esophagus. Cancer research*, *64*(10), 3414–3427. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3249

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1897*, 289–298. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Malumbres M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome biology*, *15*(6), 122. https://doi.org/10.1186/gb4184

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, *9*(3), 153–166. https://doi.org/10.1038/nrc2602

Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S… (2015). Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6237), 880–886. https://doi.org/10.1126/science.aaa6806

Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta*, *1805*(1), 105–117. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002

McHugh, D., & Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of cell biology*, *217*(1), 65–77. https://doi.org/10.1083/jcb.201708092

Michor, F., & Polyak, K. (2010). The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, *3*(11), 1361–1364. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0234

Miller, M. A., Nelson, S. L., Turk, J. R., Pace, L. W., Brown, T. P., Shaw, D. P., Fischer, J. R., & Gosser, H. S. (1991). Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Veterinary pathology*, *28*(5), 389–395. https://doi.org/10.1177/030098589102800506

Modiano, J. (2012). The etiology of cancer. *In* S. Withrow, D. Vail & R. Page (Eds.) *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology* (5ªEd., pp. 1-15). Missouri: Elsevier.

Modiano, J. F., Johnson, L. D., & Bellgrau, D. (2008). Negative regulators in homeostasis of naïve peripheral T cells. *Immunologic research*, *41*(2), 137–153. https://doi.org/10.1007/s12026-008-8017-1

Modiano, J. F., Ritt, M. G., Wojcieszyn, J., & Smith, R., 3rd (1999). Growth arrest of melanoma cells is differentially regulated by contact inhibition and serum deprivation. *DNA and cell biology*, *18*(5), 357–367. https://doi.org/10.1089/104454999315259

Mohseni, S., Aboeerad, M., Sharifi, F., Tavangar, S. M., & Mohajeri-Tehrani, M. (2019). Associations of Ki-67 Labeling Index with Clinical and Paraclinical Features of Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas: A Single Center Report from Iran. *International journal of endocrinology and metabolism*, *17*(2), e81983. https://doi.org/10.5812/ijem.81983

Mueller, M. M., & Fusenig, N. E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *4*(11), 839–849. https://doi.org/10.1038/nrc1477

Munday, J. S., Thomson, N. A., & Luff, J. A. (2017). Papillomaviruses in dogs and cats. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, *225*, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.018

Murakami, Y., Tateyama, S., Rungsipipat, A., Uchida, K., & Yamaguchi, R. (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *The Journal of veterinary medical science*, *62*(7), 743–750. https://doi.org/10.1292/jvms.62.743

Murphy S. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. *Journal of feline medicine and surgery*, *15*(5), 401–407. https://doi.org/10.1177/1098612X13483238

Mylonas, A., & O'Loghlen, A. (2022). Cellular Senescence and Ageing: Mechanisms and Interventions. *Frontiers in aging*, *3*, 866718. https://doi.org/10.3389/fragi.2022.866718

Myoung, H., Kim, M. J., Lee, J. H., Ok, Y. J., Paeng, J. Y., & Yun, P. Y. (2006). Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, *35*(11), 1005–1010. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2006.07.016

Nagamine, E., Hirayama, K., Matsuda, K., Okamoto, M., Ohmachi, T., Uchida, K., Kadosawa, T., & Taniyama, H. (2017). Invasive Front Grading and Epithelial-Mesenchymal Transition in

Canine Oral and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Veterinary pathology*, *54*(5), 783–791. https://doi.org/10.1177/0300985817707005

Ng, C. K., Pemberton, H. N., & Reis-Filho, J. S. (2012). Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications. *Expert review of anticancer therapy*, *12*(8), 1021–1032. https://doi.org/10.1586/era.12.85

Nielsen, T. O., Leung, S. C. Y., Rimm, D. L., Dodson, A., Acs, B., Badve, S…(2021). Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *Journal of the National Cancer Institute*, *113*(7), 808–819. https://doi.org/10.1093/jnci/djaa201

Nishimura, R., Osako, T., Okumura, Y., Hayashi, M., Toyozumi, Y., & Arima, N. (2010). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Experimental and therapeutic medicine*, *1*(5), 747–754. https://doi.org/10.3892/etm.2010.133

Noguchi, M., Kinjyo, H., Kohama, G. I., & Nakamori, K. (2002). Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, *93*(6), 682–687. https://doi.org/10.1067/moe.2002.122341

Nowell P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*, *194*(4260), 23–28. https://doi.org/10.1126/science.959840

Ondruschka, C., Buhtz, P., Motsch, C., Freigang, B., Schneider-Stock, R., Roessner, A., & Boltze, C. (2002). Prognostic value of MMP-2, -9 and TIMP-1,-2 immunoreactive protein at the invasive front in advanced head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology, research and practice*, *198*(8), 509–515. https://doi.org/10.1078/S0344-0338(04)70292-7

Ohyashiki, J. H., Sashida, G., Tauchi, T., & Ohyashiki, K. (2002). Telomeres and telomerase in hematologic neoplasia. *Oncogene*, *21*(4), 680–687. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205075

Ortenberg, R., Sapoznik, S., Zippel, D., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Kubi, A… (2015). Serum CEACAM1 Elevation Correlates with Melanoma Progression and Failure to Respond to Adoptive Cell Transfer Immunotherapy. *Journal of immunology research*, *2015*, 902137. https://doi.org/10.1155/2015/902137

Ostrand-Rosenberg S. (2008). Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development*, *18*(1), 11–18. https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.12.007

Otto A. M. (2016). Warburg effect(s)-a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer & metabolism*, *4*, 5. https://doi.org/10.1186/s40170-016-0145-9

Ouhtit, A., Muller, H. K., Gorny, A., & Ananthaswamy, H. N. (2000). UVB-induced experimental carcinogenesis: dysregulation of apoptosis and p53 signalling pathway. *Redox report: communications in free radical research*, *5*(2-3), 128–129. https://doi.org/10.1179/135100000101535447

Pantanowitz, L., Valenstein, P. N., Evans, A. J., Kaplan, K. J., Pfeifer, J. D., Wilbur, D. C., Collins, L. C., & Colgan, T. J. (2011). Review of the current state of whole slide imaging in pathology. *Journal of pathology informatics*, *2*, 36. https://doi.org/10.4103/2153-3539.83746

Pakhrin, B., Kang, M. S., Bae, I. H., Park, M. S., Jee, H., You, M. H... (2007). Retrospective study of canine cutaneous tumors in Korea. *Journal of veterinary science*, *8*(3), 229–236. https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.229

Park, J. J., Oh, K., Lee, G. W., Bang, G., Park, J. H., Kim, H. B… (2023). Defining regorafenib as a senomorphic drug: therapeutic potential in the age-related lung disease emphysema. *Experimental & molecular medicine*, *55*(4), 794–805. https://doi.org/10.1038/s12276-023-00966-6

Parrado, C., Mercado-Saenz, S., Perez-Davo, A., Gilaberte, Y., Gonzalez, S., & Juarranz, A. (2019). Environmental Stressors on Skin Aging. Mechanistic Insights. *Frontiers in pharmacology*, *10*, 759. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00759

Parrinello, S., Coppe, J. P., Krtolica, A., & Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of cell science*, *118*(Pt 3), 485–496. https://doi.org/10.1242/jcs.01635

Partridge, M., Emilion, G., Pateromichelakis, S., A'Hern, R., Lee, G., Phillips, E., & Langdon, J. (1999). The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *British journal of cancer*, *79*(11-12), 1821–1827. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690290

Piffkò, J., Bànkfalvi, A., Ofner, D., Rasch, D., Joos, U., & Schmid, K. W. (1997). Standardized demonstration of silver-stained nucleolar organizer regions-associated proteins in archival oral squamous cell carcinomas and adjacent non-neoplastic mucosa. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *10*(2), 98–104.

Pihan, G., & Doxsey, S. J. (2003). Mutations and aneuploidy: co-conspirators in cancer? *Cancer cell*, *4*(2), 89–94. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00195-8

Pinello, K., Amorim, I., Pires, I., Canadas-Sousa, A., Catarino, J., Faísca, P… (2022). Vet-OncoNet: Malignancy Analysis of Neoplasms in Dogs and Cats. *Veterinary sciences*, *9*(10), 535. https://doi.org/10.3390/vetsci9100535

Pollard, D. T., Earnsshaw, C. W., Lippincott-Schwartz & Jonhson, T. G. (2017). Chapter 41 – G1 phase and regulation of cell proliferation. Cell Biology. 3rd edition. Elsevier. P. 713. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-34126-4.00041-4.

Priester W. A. (1973). Skin tumors in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *Journal of the National Cancer Institute*, *50*(2), 457–466. https://doi.org/10.1093/jnci/50.2.457

Proschowsky, H. F., Rugbjerg, H., & Ersbøll, A. K. (2003). Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Preventive veterinary medicine*, *58*(1-2), 63–74. https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00010-2

Pylaeva, E., Korschunow, G., Spyra, I., Bordbari, S., Siakaeva, E., Ozel, I… (2022). During early stages of cancer, neutrophils initiate anti-tumor immune responses in tumor-draining lymph nodes. *Cell reports*, *40*(7), 111171. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111171

Ragab, H. M., Samy, N., Afify, M., El Maksoud, N. A., & Shaaban, H. M. (2018). Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, *16*(2), 479–484. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.002

Ramón Y Cajal, S., Sesé, M., Capdevila, C., Aasen, T., De Mattos-Arruda, L., Diaz-Cano, S. J., Hernández-Losa, J., & Castellví, J. (2020). Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *98*(2), 161–177. https://doi.org/10.1007/s00109-020-01874-2

Reid, M. D., Balci, S., Saka, B., & Adsay, N. V. (2014). Neuroendocrine tumors of the pancreas: current concepts and controversies. *Endocrine pathology*, *25*(1), 65–79. https://doi.org/10.1007/s12022-013-9295-2

Renzi, A., Morandi, L., Lenzi, J., Rigillo, A., Bettini, G., Bellei, E... (2020). Analysis of DNA methylation and TP53 mutational status for differentiating feline oral squamous cell carcinoma from non-neoplastic mucosa: A preliminary study. *Veterinary and comparative oncology*, *18*(4), 825–837. https://doi.org/10.1111/vco.12624

Ricci, C., Casadei, R., Taffurelli, G., Campana, D., Ambrosini, V., Pagano, N... (2016). Validation of the 2010 WHO classification and a new prognostic proposal: A single centre

retrospective study of well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumours. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, *16*(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/j.pan.2016.02.002

Rivera C. (2015). Essentials of oral cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(9), 11884–11894.

Rodney, A. R., Skidmore, Z. L., Grenier, J. K., Griffith, O. L., Miller, A. D., Chu, S... (2023). Genomic landscape and gene expression profiles of feline oral squamous cell carcinoma. *Frontiers in veterinary science*, *10*, 1079019. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1079019

Ropponen, K. M., Eskelinen, M. J., Lipponen, P. K., Alhava, E., & Kosma, V. M. (1997). Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *The Journal of pathology*, *182*(3), 318–324. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199707)182:3<318::AID-PATH862>3.0.CO;2-6

Sakai, H., Yamane, T., Yanai, T., Shirai, N., & Masegi, T. (2001). Expression of cyclin kinase inhibitor p27(Kip1) in skin tumours of dogs. *Journal of comparative pathology*, *125*(2-3), 153–158. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0492

Sanegre, S., Eritja, N., de Andrea, C., Diaz-Martin, J., Diaz-Lagares, Á., Jácome, M. A… (2021). Characterizing the Invasive Tumor Front of Aggressive Uterine Adenocarcinoma and Leiomyosarcoma. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 670185. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670185

Santarosa, M., & Ashworth, A. (2004). Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochimica et biophysica acta*, *1654*(2), 105–122. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.01.001

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T… (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, *9*(7), 676–682. https://doi.org/10.1038/nmeth.2019

Schmitt, J., Haufe, E., Trautmann, F., Schulze, H. J., Elsner, P., Drexler, H… FB-181 Study Group (2018). Is ultraviolet exposure acquired at work the most important risk factor for cutaneous squamous cell carcinoma? Results of the population-based case-control study FB-181. *The British journal of dermatology*, *178*(2), 462–472. https://doi.org/10.1111/bjd.15906

Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, *182*(3), 311–322. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9

Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S. L., Oh, D… (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *32*(37), 12950–12960. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2017-12.2012

Sharma, A., Merritt, E., Hu, X., Cruz, A., Jiang, C., Sarkodie, H… (2019). Non-Genetic Intra-Tumor Heterogeneity Is a Major Predictor of Phenotypic Heterogeneity and Ongoing Evolutionary Dynamics in Lung Tumors. *Cell reports*, *29*(8), 2164–2174.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.045

Sharma, M., Sah, P., Sharma, S. S., & Radhakrishnan, R. (2013). Molecular changes in invasive front of oral cancer. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, *17*(2), 240–247. https://doi.org/10.4103/0973-029X.119740

Sharma, R., Rehani, S., Mehendiratta, M., Kardam, P., Kumra, M., Mathias, Y., Yadav, J., & Sahay, K. (2015). Architectural Analysis of Picrosirius Red Stained Collagen in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma using Polarization Microscopy. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *9*(12), EC13–EC16. https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/13476.6872

Si, Y., Merz, S. F., Jansen, P., Wang, B., Bruderek, K., Altenhoff, P… (2019). Multidimensional imaging provides evidence for down-regulation of T cell effector function by MDSC in human cancer tissue. *Science immunology*, *4*(40), eaaw9159. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw9159

Skjervold, A. H., Pettersen, H. S., Valla, M., Opdahl, S., & Bofin, A. M. (2022). Visual and digital assessment of Ki-67 in breast cancer tissue - a comparison of methods. *Diagnostic pathology*, *17*(1), 45. https://doi.org/10.1186/s13000-022-01225-4

Smith, H. A., & Kang, Y. (2013). The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, *91*(4), 411–429. https://doi.org/10.1007/s00109-013-1021-5

Soares, M., Ribeiro, R., Carvalho, S., Peleteiro, M., Correia, J., & Ferreira, F. (2016). Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value?. *Veterinary pathology*, *53*(1), 37–43. https://doi.org/10.1177/0300985815588606

Soliman, N. A., & Yussif, S. M. (2016). Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. *Cancer biology & medicine*, *13*(4), 496–504. https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0066

Soltero-Rivera, M. M., Krick, E. L., Reiter, A. M., Brown, D. C., & Lewis, J. R. (2014). Prevalence of regional and distant metastasis in cats with advanced oral squamous cell carcinoma: 49 cases (2005-2011). *Journal of feline medicine and surgery*, *16*(2), 164–169. https://doi.org/10.1177/1098612X13502975

Sreeja, C., Gobu, P., Bhavna P., Nachiammai, N., Sathish, M. R., Harini P. (2017). Histological malignancy grading systems – review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research,* 2348-6805, doi: 10.21276/jamdsr

Stenbäck, F., Mäkinen, M. J., Jussila, T., Kauppila, S., Risteli, J., Talve, L., & Risteli, L. (1999). The extracellular matrix in skin tumor development-a morphological study. *Journal of cutaneous pathology*, *26*(7), 327–338. https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1999.tb01854.x

Stratigos, A., Garbe, C., Lebbe, C., Malvehy, J., del Marmol, V., Pehamberger, H…, European Dermatology Forum (EDF), European Association of Dermato-Oncology (EADO), & European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) (2015). Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, *51*(14), 1989–2007. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.06.110

Suciu, C., Muresan, A., Cornea, R., Suciu, O., Dema, A., & Raica, M. (2014). Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncology letters*, *7*(1), 107–114. https://doi.org/10.3892/ol.2013.1654

Sumner, W. A., Stokes, W. A., Oweida, A., Berggren, K. L., McDermott, J. D., Raben, D… (2017). Survival impact of pre-treatment neutrophils on oropharyngeal and laryngeal cancer patients undergoing definitive radiotherapy. *Journal of translational medicine*, *15*(1), 168. https://doi.org/10.1186/s12967-017-1268-7

Sundberg, J. P., Van Ranst, M., Montali, R., Homer, B. L., Miller, W. H., Rowland, P. H... (2000). Feline papillomas and papillomaviruses. *Veterinary pathology*, *37*(1), 1–10. https://doi.org/10.1354/vp.37-1-1

Swanton C. (2012). Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer research*, *72*(19), 4875–4882. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2217

Tabassum, D. P., & Polyak, K. (2015). Tumorigenesis: it takes a village. *Nature reviews. Cancer*, *15*(8), 473–483. https://doi.org/10.1038/nrc3971

Tang, S., Xu, D., & Zhou, B. (2010). Analysis of P53 mutation and invasion front grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, *30*(4), 525–529. https://doi.org/10.1007/s11596-010-0462-0

Tigan, A. S., Bellutti, F., Kollmann, K., Tebb, G., & Sexl, V. (2016). CDK6-a review of the past and a glimpse into the future: from cell-cycle control to transcriptional regulation. *Oncogene*, *35*(24), 3083–3091. https://doi.org/10.1038/onc.2015.407

Tlsty, T. D., & Coussens, L. M. (2006). Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annual review of pathology*, *1*, 119–150. https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100224

Tumuluri, V., Thomas, G. A., & Fraser, I. S. (2004). The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, *33*(4), 204–208. https://doi.org/10.1111/j.0904-2512.2004.00178.x

Venigella, A., Charu, S., Rao, S., Rao, N. (2010). Evaluation of collagen in diferente grades of oral squamous cell carcinoma by using the picrosirius red stain-a histological study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research,* 4; 3444-3449.

Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, *10*(8), 789–799. https://doi.org/10.1038/nm1087

Xie, S., Liu, Y., Qiao, X., Hua, R. X., Wang, K., Shan, X. F., & Cai, Z. G. (2016). What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma?. *Journal of Cancer*, *7*(7), 758–767. https://doi.org/10.7150/jca.14214

Xu, G., Li, C., Wang, Y., Ma, J., & Zhang, J. (2021). Correlation between preoperative inflammatory markers, Ki-67 and the pathological grade of glioma. *Medicine*, *100*(36), e26750. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000026750

Walter, J. H., & Schwegler, K. (1992). Untersuchungen zur Häufigkeit von Neoplasien bei sezierten Hunden in Berlin (West) [The frequency of neoplasms in dogs dissected in Berlin]. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*, *39*(5), 328–341.

Wilson, D. F., Jiang, D. J., Pierce, A. M., & Wiebkin, O. W. (1999). Oral cancer: role of the basement membrane in invasion. *Australian dental journal*, *44*(2), 93–97. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1999.tb00207.x

Wolff, A. C., Hammond, M. E., Hicks, D. G., Dowsett, M., McShane, L. M., Allison, K. H… College of American Pathologists (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(31), 3997–4013. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9984

Wu, S., Cho, E., Li, W. Q., Weinstock, M. A., Han, J., & Qureshi, A. A. (2016). History of Severe Sunburn and Risk of Skin Cancer Among Women and Men in 2 Prospective Cohort Studies. *American journal of epidemiology*, *183*(9), 824–833. https://doi.org/10.1093/aje/kwv282

Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis*, *5*, 1000165. https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165

Yashiro, M., Ikeda, K., Tendo, M., Ishikawa, T., & Hirakawa, K. (2005). Effect of organ-specific fibroblasts on proliferation and differentiation of breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, *90*(3), 307–313. https://doi.org/10.1007/s10549-004-5364-z

Yilmaz, H., Demirag, G., Sullu, Y., & Yilmaz, A. (2021). Predictive Significance of Ki-67 and Platelet Lymphocyte Ratio in Patients with Gastric Cancer Receiving Neoadjuvant FLOT Chemotherapy. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan: JCPSP*, *30*(5), 546–552. https://doi.org/10.29271/jcpsp.2021.05.546

Yamamoto, N., Mizoe, J.e, Numasawa, H., Tsujii, H., Shibahara, T., & Noma, H. (2003). Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, *39*(8), 796–805. https://doi.org/10.1016/s1368-8375(03)00079-4

Yang, Z., Tang, L. H., & Klimstra, D. S. (2011). Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *The American journal of surgical pathology*, *35*(6), 853–860. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31821a0696

Yap, T. A., Gerlinger, M., Futreal, P. A., Pusztai, L., & Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity: seeing the wood for the trees. *Science translational medicine*, *4*(127), 127ps10. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003854

Zandberg, D. P., Tallon, L. J., Nagaraj, S., Sadzewicz, L. K., Zhang, Y., Strome, M. B… (2019). Intratumor genetic heterogeneity in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head & neck*, *41*(8), 2514–2524. https://doi.org/10.1002/hed.25719

Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., & Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry. Biokhimiia*, *75*(13), 1563–1583. https://doi.org/10.1134/s0006297910130055

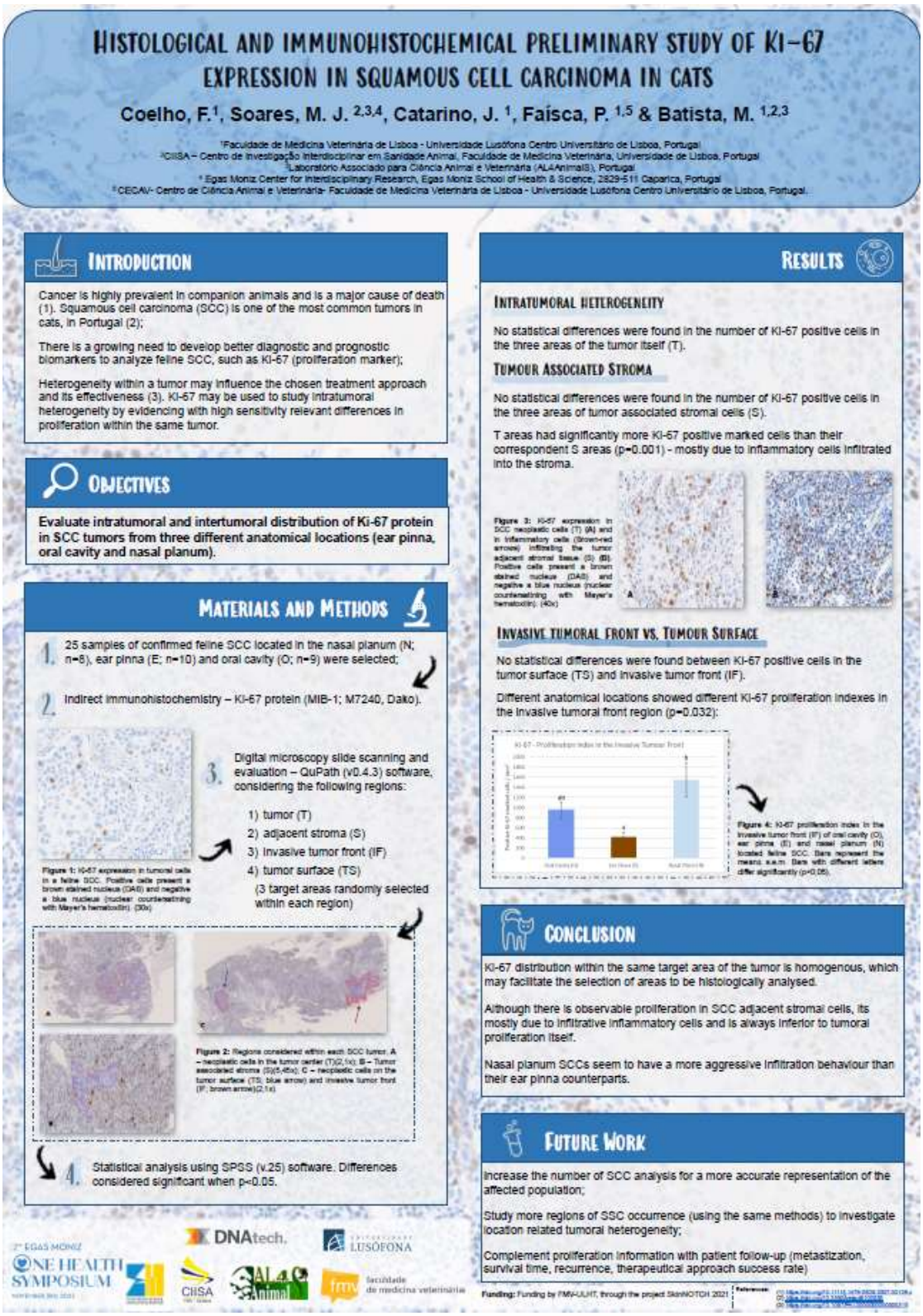


Figura A1 – Póster científico intitulado "Estudo histológico e imunohistoquímico preliminar da expressão de Ki-67 em carcinomas das células escamosas em gatos", apresentado no "The 2nd Egas Moniz One Health Symposium" (2023).

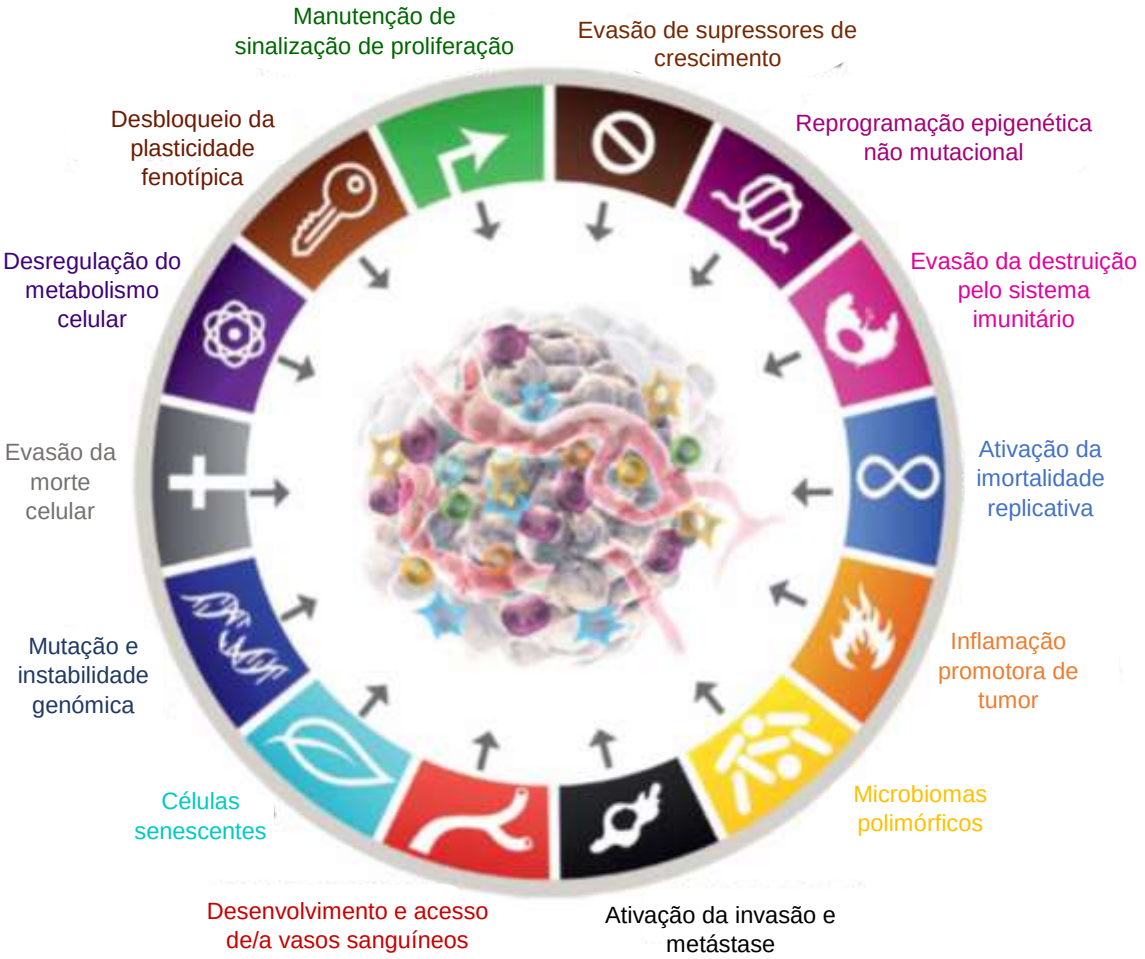


Figura A2 – As “características do cancro” (Adaptado de Hanahan, 2022).

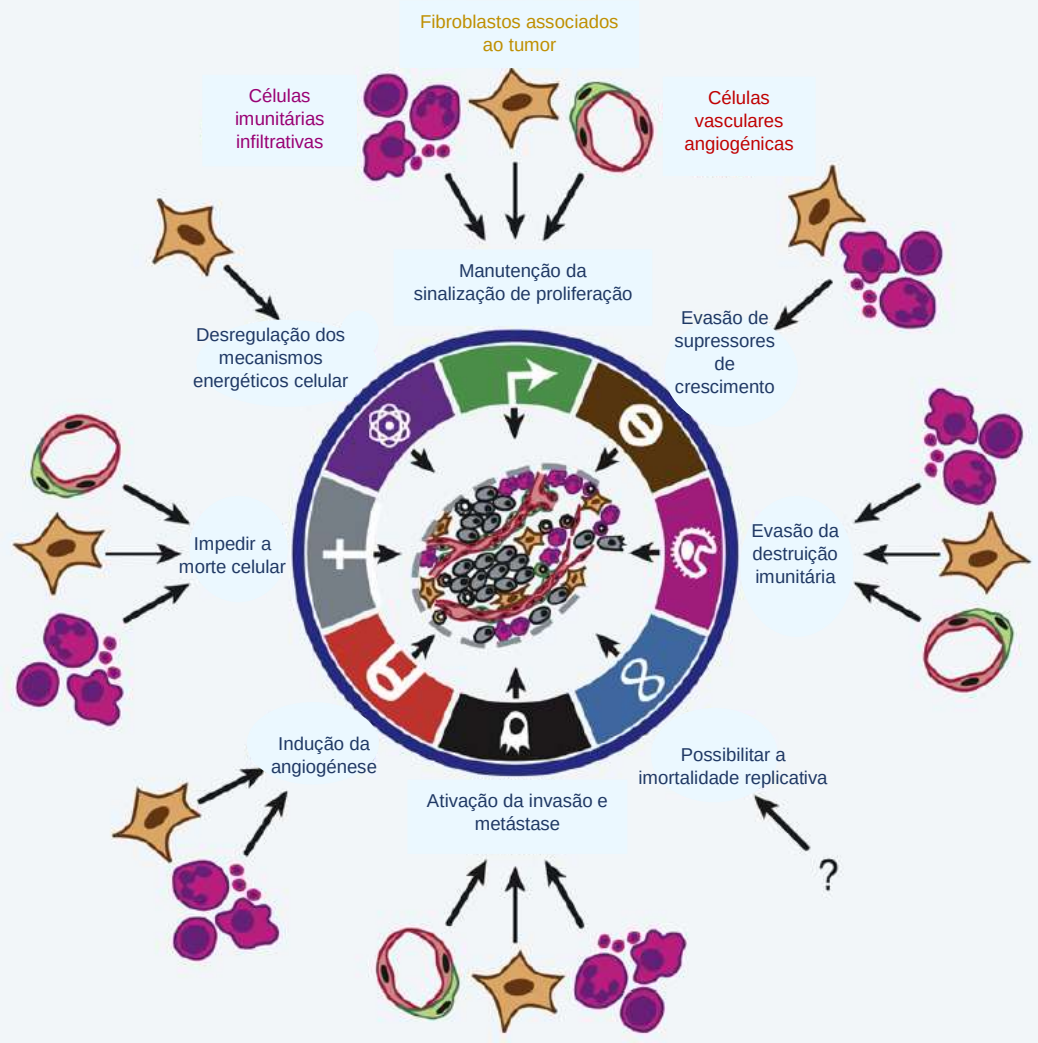


Figura A3 – Contribuição do microambiente para as “características do cancro” (Adaptado de Hanahan & Coussens, 2012).

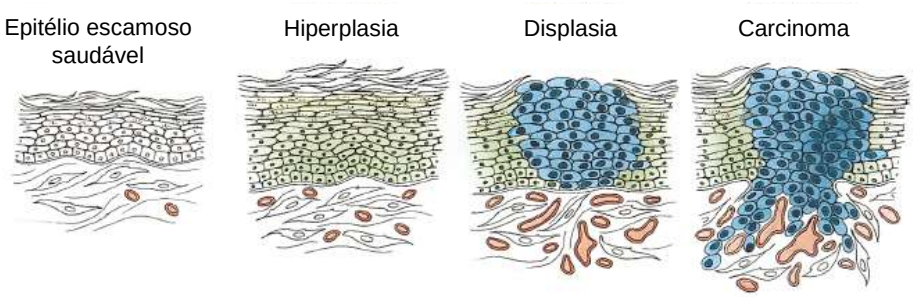


Figura A4 – Estádios do desenvolvimento de carcinoma das células escamosas. O processo inicia-se com a hiperplasia dos queratinócitos associado a um ligeiro aumento da densidade de vasos sanguíneos. De seguida há progressão para displasia com queratinócitos morfologicamente aberrantes com elevado índice de proliferação e abundante neovascularização. Por fim, dá-se a invasão do tecido tumoral no estroma associado ao tumor (Adaptado de Hanahan & Folkman, 1996)

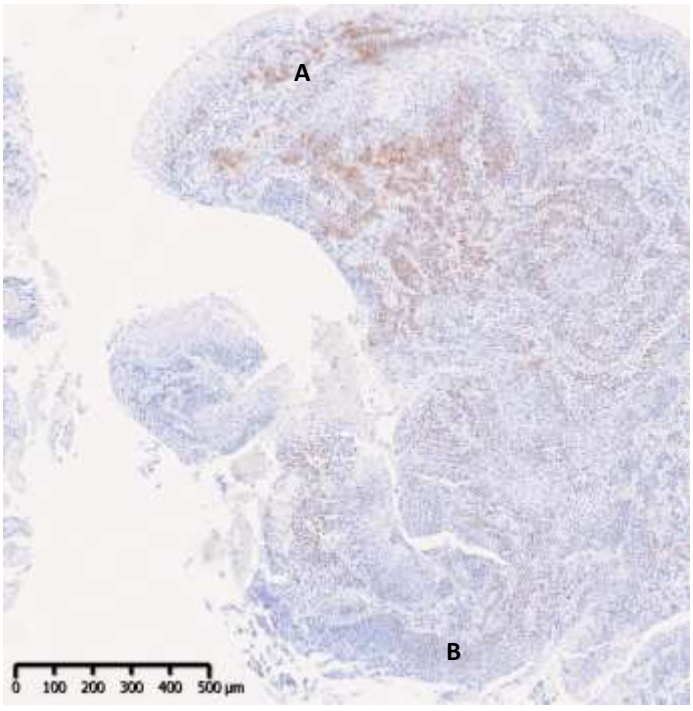


Figura A5 – Sinalização da superfície tumoral (**A**) e frente invasora (**B**) em CCE felino. Marcação de células com Ki-67 visível através da coloração com DAB e hematoxilina de Mayer (objetiva 4,9x).

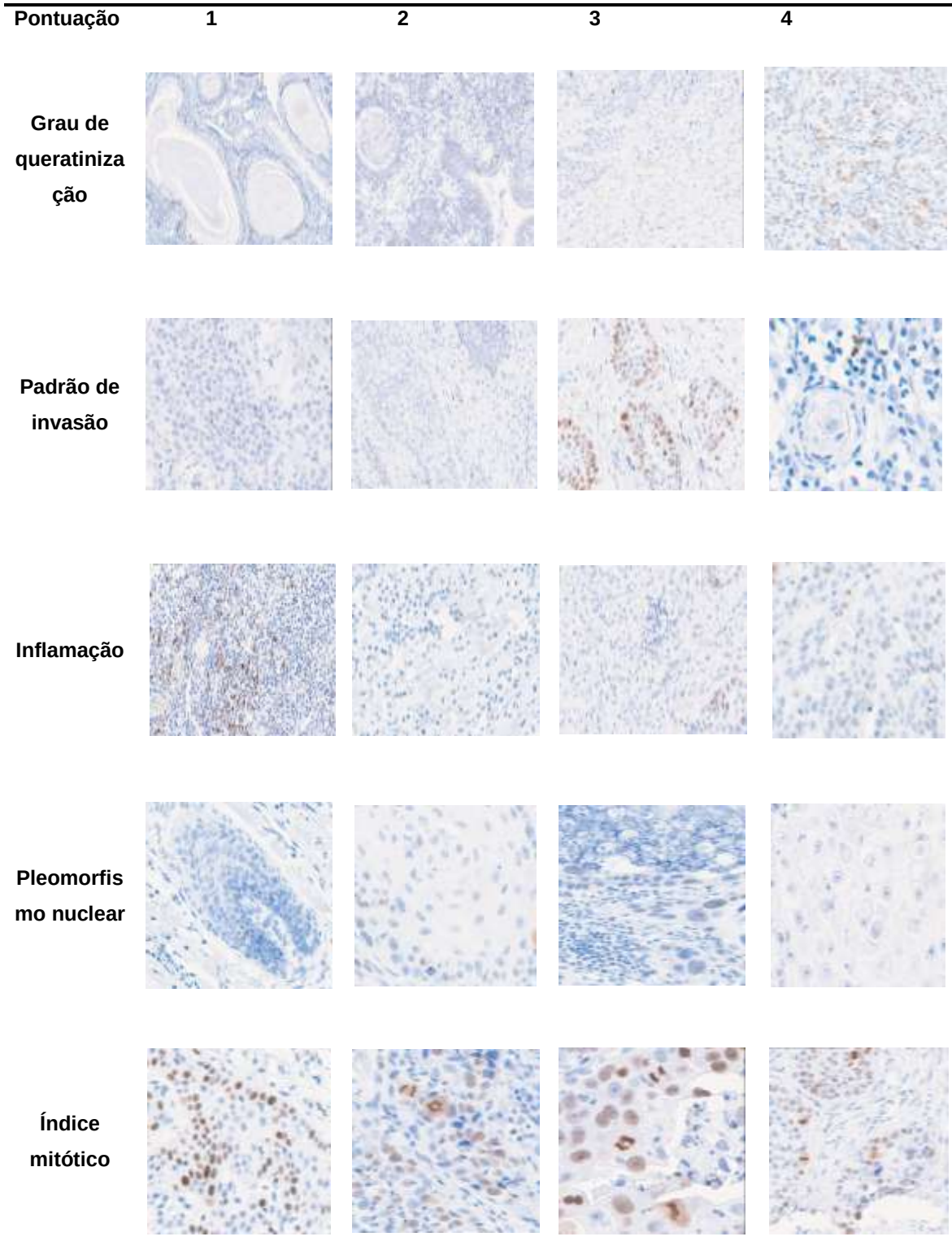


Figura A6 – Sistema de classificação do grau de malignidade para CCE com imagens representativas, células marcadas com Ki-67, visível através da coloração DAB e hematoxilina de Mayer (Adaptado de Nagamine *et al*, 2017).

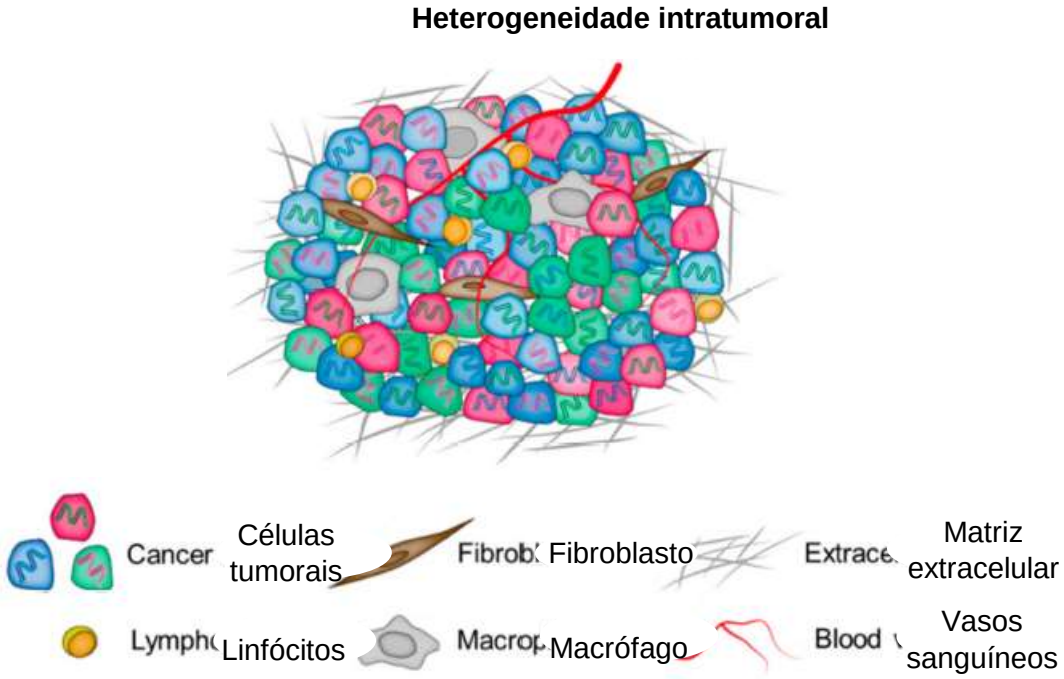


Figura A7 – Heterogeneidade intratumoral. Células neoplásicas fenotipicamente distintas devido a heterogenia genómica (diferentes cores do ADN) e epigenética (diferentes cores das células) e os componentes do microambiente que as envolve (Adaptado de Lin & Lin, 2019).