

**UNIVERSIDADE PAULISTA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**STRICTO SENSU EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS, ÍNDICE  
PROLIFERATIVO E A EXPRESSÃO DE VIMENTINA E  
FASCINA-1 EM PAPILOMAS E CARCINOMAS  
ESPINOCELULARES EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

**THALITA MICHELLE QUETÉ DOS REIS**

**SÃO PAULO**  
**2022**

**UNIVERSIDADE PAULISTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
STRICTO SENSU EM PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS, ÍNDICE  
PROLIFERATIVO E A EXPRESSÃO DE VIMENTINA E  
FASCINA-1 EM PAPILOMAS E CARCINOMAS  
ESPINOCELULARES EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental, sob orientação do Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

**THALITA MICHELLE QUETÉ DOS REIS**

**SÃO PAULO  
2022**

Reis, Thalita Michelle Queté dos.

Relação entre parâmetros histológicos, índice proliferativo e a expressão de vimentina e fascina-1 em papilomas e carcinomas espinocelulares em cães / Thalita Michelle Queté dos Reis. - 2022.

20 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.  
Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

1. Diagnóstico. 2. Imuno-histoquímica. 3. Oncologia veterinária.  
4. Transição epitélio-mesenquimal. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Título.

**THALITA MICHELLE QUETÉ DOS REIS**

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS, ÍNDICE  
PROLIFERATIVO E A EXPRESSÃO DE VIMENTINA E  
FASCINA-1 EM PAPILOMAS E CARCINOMAS  
ESPINOCELULARES EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, como para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

\_\_\_\_\_  
Prof.

## **Agradecimentos**

Começo agradecendo, de forma especial, meu orientador Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela orientação nesse estudo e descobertas no mundo da oncologia. Obrigada pela paciência, ensinamentos e auxílios ao longo de todo o mestrado.

A minha família, meu agradecimento mais que especial. A qual estive ausente em diversos momentos, mas que sempre me apoiou nos estudos e na jornada da vida. Em especial a meu marido Ricardo, pelas palavras de encorajamento, auxílio e paciência durante toda a etapa do mestrado. Aos meus meninos de pelo, penas e escamas: Yan Guilan, Tina Turner, Lemy Kilmister e Janis Joplin, pelos momentos de companhia e carinho ao longo dos estudos.

Aos demais professores da pós-graduação, minha gratidão por todos os ensinamentos, correções e motivações nessa jornada de dois anos, com certeza levarei um pouquinho de todos comigo. Em especial ao professor Dr. Giovani Peres pelos ensinamentos e paciência na disciplina de estatística. A amiga de mestrado Patrícia Santos, pelas conversas, estudos, risadas e exemplo de força de vontade e de viver. Aos funcionários da pós e do laboratório, sempre muito atenciosos e prestativos, meu muito obrigado.

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que conseguisse chegar nesse momento, tão precioso, importante, mas também um dos momentos mais difíceis da minha vida. A pandemia mudou minha vida em vários sentidos, e os estudos por mais difíceis que tenham sido, foram meu porto seguro para continuar. Obrigada a todos!!!

# Relação entre parâmetros histológicos, índice proliferativo e a expressão de vimentina e fascina-1 em papilomas e carcinomas espinocelulares em cães

Thalita M. Q. Reis; José G. Xavier

**Abstract.** – Reis, T.M.Q., Xavier, J.G. 2022. **Relationship between histological parameters, proliferative index and the expression of vimentin and fascin-1 in papillomas and squamous cell carcinomas in dogs.** Programa de Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), r. Dr. Bacelar, 1212, Vila Clementino, São Paulo, SP, CEP: 04026-002. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2022. Email: [thalita@cvquete.com.br](mailto:thalita@cvquete.com.br)

Veterinary oncology is a rising specialty, and the increased survival of companion animals and the growing number of neoplasms in these species have collaborated. Epithelial neoplasms make up a relevant fraction of these conditions, demanding a greater understanding of their biological behavior. In this study, the proliferative index (immunostaining for Ki-67) and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) were investigated in samples of papillomas and oral squamous cell carcinomas (SCCs) with the use of vimentin and fascin-1, comparing the findings with the histological classification and grading. EMT involves a series of enabling events for neoplastic invasion and spread, directly related to the animal's fate. Vimentin has been used as a marker of EMT in several studies, demonstrating its participation in critical functions such as migration and cell signaling, with expression particularly evident in areas bordering tumor growth. Fascin-1 expression, on the other hand, is associated with motility gain and modulation of extracellular matrix rigidity, showing, in human neoplasms, a correlation with reduced survival time, local invasion, and metastatic increment. Studies on its expression in canine neoplasms are scarce. In our study, 5 papillomas and 10 SCCs were evaluated. The proliferative index was higher in malignant lesions (>30%). Vimentin expression occurred only in carcinomas, and in these, in invasive neoplastic cells, in blocks, or alone. The fascin-1 expression was identified both in benign and malignant lesions but with greater labeling intensity in the latter. There was a parallel between high histological grade, higher proliferative index, and expression of vimentin and fascin-1 in neoplastic cells, indicating that EMT is related to indicators of malignancy. Such findings suggest the need to increase the number of cases and investigate the relationship between these markers and tumor recurrence, production of metastases, and survival time, evaluating their potential as prognostic indicators and therapeutic targets.

Index terms: diagnosis, immunohistochemistry, veterinary oncology, epithelial-mesenchymal transition.

**Resumo.** – [Relação entre parâmetros histológicos, índice proliferativo e a expressão de vimentina e fascina-1 em papilomas e carcinomas espinocelulares em cães.] A oncologia veterinária é uma especialidade em expansão, associada ao aumento da sobrevivência dos animais de companhia e a casuística crescente de neoplasias nessas espécies. As neoplasias epiteliais compõem uma fração importante dessas condições, demandando uma maior compreensão de seu comportamento biológico. Neste estudo foram investigadas em amostras de papilomas e carcinomas espinocelulares (CECs) de cães, o índice proliferativo (imunomarcagem para o Ki-67) e a transição epitelial-mesênquimal (TEM), com o emprego da vimentina e fascina-1, comparando-se os achados com a classificação e gradação histopatológicas. A TEM envolve uma série de eventos capacitantes para a invasão e disseminação neoplásica, diretamente relacionados ao destino do animal. A vimentina vem sendo utilizada como marcador da TEM em diversos estudos, demonstrando participação em funções críticas como migração e sinalização celular, com expressão particularmente evidente em áreas limítrofes de crescimento tumoral. Já a expressão de fascina-1 é associada a ganho de motilidade e modulação da rigidez da matriz extracelular, apresentando, em neoplasias humanas, correlação com a redução do tempo de sobrevivência, invasão local e incremento metastático. Estudos sobre sua expressão em neoplasias caninas são escassos. Em nosso estudo foram avaliados 5 papilomas e 10 CECs. O índice proliferativo foi superior nas lesões malignas (>30%). A expressão de vimentina ocorreu em uma das amostras de papiloma e em todos os carcinomas, e nestes em células neoplásicas invasoras, em blocos ou isoladamente. A expressão de vimentina ocorreu apenas nos carcinomas, e nestes em células neoplásicas invasoras, em blocos ou isoladamente. A expressão de fascina-1 foi identificada em lesões benignas e malignas, porém com maior intensidade de marcação nas últimas. Houve um paralelismo entre elevado grau histopatológico, maior índice proliferativo e expressão de vimentina e de fascina-1 nas células neoplásicas, indicando que a TEM está relacionada a indicadores de malignidade. Tais achados sinalizam para necessidade do aumento da casuística e a investigação da relação entre esses marcadores e recorrência tumoral, produção de metástases e tempo de sobrevivência, avaliando seu potencial como indicadores prognósticos e alvos terapêuticos.

Termos de indexação: diagnóstico, imuno-histoquímica, oncologia veterinária, transição epitelial-mesênquimal.

## Introdução

A população neoplásica é naturalmente heterogênea, evento alicerçado na característica instabilidade genômica das malignidades (Hanahan & Weinberg, 2011), havendo uma particular diversidade nas áreas periféricas tumorais, constituindo a fronteira entre a neoplasia em expansão e o tecido do hospedeiro prestes a ser invadido (Bryne et al., 1992; Nagamine et al., 2017). Nesse microambiente uma modulação fenotípica e funcional das células neoplásicas, a transição epitelial-mesenquimal (TEM), otimiza seu potencial invasivo. Durante a TEM as células neoplásicas perdem a expressão de moléculas de adesão, importantes no estabelecimento de vínculos célula/célula e célula/matriz extracelular, e adquirem um fenótipo mesenquimal, favorecendo sua separação das células vizinhas e avanço para territórios adjacentes e distantes (Lo et al, 2017). Assim, a TEM, é um processo complexo, que ativa múltiplas vias sinalizadoras, envolvendo várias famílias de fatores de transcrição e a interação entre elas (Das, et. al., 2018), conferindo às células um fenótipo migratório. Nesse sentido, marcadores moleculares do processo representam potenciais indicadores prognósticos e alvos terapêuticos (Tan, et al., 2013).

Dentre as mais relevantes neoplasias epiteliais caninas estão as derivadas do ceratinócitos. Os papilomas, que acometem frequentemente os cães, são massas neoplásicas benignas, podendo ocorrer em qualquer região do corpo, como pele e mucosas, sendo a localização mais frequente a cavidade oral (Monteiro et al., 2008; Medleau, et al., 2009). Já os carcinomas espinocelulares (CECs) são neoplasias malignas com diferenciação para ceratinócitos, podendo surgir em pele e mucosas. A agressividade biológica é variada, sendo o pior prognóstico associado a lesões orais (Meuten, 2016), que exibem com maior frequência envolvimento nodal e desenvolvimento de metástases, que chega a 20% dos casos (Head et al., 2003, Todoroff & Brodey, 1979). Enquanto na espécie humana os CECs representam a principal malignidade bucal, nos cães surgem como o segundo tipo de câncer mais frequente na região (Liptak & Withrow, 2007; Lambert et al., 2011). Na cavidade oral são encontrados em gengiva, palato, lábios, mucosa jugal e no assoalho da cavidade (Marreta, 2001; Requicha et al., 2015). A apresentação geralmente se dá por infiltração e destruição da submucosa, do tecido muscular local, ossos e seios nasais, de forma lenta (Requicha et al., 2015).

No presente estudo busca-se investigar a relação entre diagnóstico, graduação histopatológica e índice proliferativo e a expressão de marcadores da TEM em lesões neoplásicas, benignas e malignas, derivadas de ceratinócitos em cães.

A imuno-histoquímica é uma importante ferramenta auxiliar no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico em neoplasias. O ki-67 funciona marcando um antígeno nuclear das células em proliferação estando intimamente ligado ao ciclo celular, podendo ser avaliado nas fases G1, G2 e M, sendo que somente em G0 não é expresso. Devido a esse comportamento, pode ser utilizado para mensuração da proliferação celular (Quinn, et. al., 1990).

A vimentina, um marcador mesenquimal, costuma ter sua expressão aumentada em células neoplásicas epiteliais migratórias, em particular nas áreas limítrofes de crescimento tumoral, bem caracterizada em diversos carcinomas humanos (Kokkinos, et. al., 2007). No entanto, sua expressão também é descrita em células epiteliais envolvidas na embriogênese e na placentação (Gilles, et. al., 1999). Já a fascina-1, uma proteína empacotadora de actina, vem se destacando devido sua expressão estar ligada a comportamento clínico agressivo, associada a um tempo curto de sobrevida e alta taxa metastática em vários tumores humanos (Yamada, et. al., 2011). Age por meio do rearranjo dos feixes de actina, promovendo a invasão e metástase das células tumorais, participando na

formação de lamelipódios e filopódios, alterando a adesão célula-célula e célula-matriz extracelular e regulando as vias de transdução de sinal (Gao, et. al., 2012).

Neste trabalho, visando ampliar o conhecimento acerca desse processo em oncologia veterinária, investigou-se a expressão de dois marcadores da TEM, um clássico, a vimentina, e um menos estudado, a fascina-1, relacionando-a com o diagnóstico e graduação de lesões neoplásicas epiteliais caninas, benignas (papilomas) e malignas (carcinomas espinocelulares) e sua atividade proliferativa.



## Materiais e métodos

**Amostras.** Foram avaliadas 15 biópsias de cães, sendo 5 amostras de papilomas, cutâneos e orais, e 10 amostras de carcinomas espinocelulares orais, selecionadas a partir dos arquivos do Laboratório Rous Patologia Animal.

**Classificação e graduação histológicas.** As amostras fixadas em formol a 10% foram submetidas a emblocagem em parafina e a microtomia, sendo os cortes histológicos de 5µm de espessura, corados pela hematoxilina-eosina, avaliados em microscópio de luz e graduados. Foram utilizados dois sistemas de graduação histológicos. Uma adaptação do estudo de Nagamine et al, 2017, utilizando 5 parâmetros centrais: ceratinização, padrão de invasão, resposta do hospedeiro, anisocariose e atividade mitótica, cada um deles pontuando de 1 a 4 (Quadro 1). Somando-se cada um dos parâmetros, pontuações de 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20, corresponderam, respectivamente, a lesões de grau I, II e III.

Característica Morfológica	Pontuação			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Alta Ceratinização (>50% das células)	Moderada Ceratinização (20-50% das células)	Mínima Ceratinização (5-20% das células)	Sem Ceratinização (0-5% das células)
Padrão de invasão	Fronteiras de infiltração bem delineadas	Infiltrativo, Cordões sólidos, bandas, e/ou fios	Pequenos grupos ou cordas de células infiltrativas (n>15)	Dissociação celular generalizada em pequenos grupos
Resposta do hospedeiro	Marcado	Moderado	Pouca	Nenhuma
Anisocitose	Pequeno pleomorfismo nuclear	Moderado Abundante pleomorfismo nuclear (50-75% células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% células maduras)
Atividade mitótica	0-1	2-3	4-5	>5

**Quadro 1.** Adaptado de Nagamine et. al., 2017.

A outra graduação empregada tem como referência central a avaliação de brotamentos tumorais nas áreas de invasão a partir de uma adaptação de Cerezo-Echevarria et al., 2020 para lesões caninas, a partir dos protocolos empregados por Jesinghaus et al., 2018 e Boxberg et al., 2019, em lesões humanas. Foram considerados para a graduação histopatológica até 10 campos de grande aumento (CGA), com alta incidência tumoral ("hot spots"), sendo mensurados e pontuados segundo o número de brotamentos e de acordo com o ninho neoplásico invasor de menor dimensão. A graduação tumoral é consequente da somatória da pontuação de cada um dos parâmetros. O brotamento tumoral foi definido como agregado celular contendo menos de 5 células neoplásicas que invadem o estroma adjacente. O valor numérico entre 1 (sem brotamento tumoral), 2 (<15 focos de brotamento) e 3 (>15 focos de brotamento) foi atribuído (Quadro 2). O menor ninho de invasão foi pontuado, sendo > 15 células tumorais: 1; entre 15 e 5 células 2; entre 2 e 4, 3; e o valor 4 para a célula que invade isoladamente o tecido adjacente. A graduação tumoral resulta da somatória dos 2 parâmetros referidos, sendo 2-3: neoplasia bem diferenciada, grau I de malignidade; 4-5: neoplasia moderadamente diferenciada, grau II de malignidade; e 6-7: neoplasia pouco diferenciada, grau III de malignidade.

<b>Atividade de Brotamento Tumoral/10campos</b>	<b>Pontuação</b>
Sem Brotamento	1
<15 Focus de brotamento	2
≥15 Focus de brotamento	3
<b>Menor tamanho do ninho de células</b>	
>15 células	1
5-15 células	2
2-4 células	3
Única célula invasora	4

**Quadro 2.** Adaptado de Jesinghaus (2018) e Boxberg (2019)

**Procedimento imuno-histoquímico.** As 15 amostras tumorais passaram pelo procedimento imuno-histoquímico, para avaliação da expressão dos marcadores, Ki-67, vimentina e fascina-1. Foram realizados, a partir das amostras selecionadas, cortes de aproximadamente 5 µm, submetidos a desparafinização, e dispostos em lâminas silanizadas, passando por recuperação antigênica pelo calor em panela de pressão, bloqueio da peroxidase endógena, seguindo-se incubação com os anticorpos primários, secundários (MACH1 Probe) e complexo peroxidase (MACH1 Polymer). A revelação foi procedida com o emprego da diaminobenzidina e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Os anticorpos empregados, sua origem e reatividade estão listados no quadro 3.

<b>Anticorpo</b>	<b>Natureza</b>	<b>Origem</b>	<b>Reatividade</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
Ki-67	monoclonal	camundongo	anti-humano	MIB-1	1:100	Biocare Medical
vimentina	monoclonal	camundongo	anti-humano	V9	1:100	Biocare Medical
fascina-1	monoclonal	camundongo	anti-humano	FSCN/417	1:50	Abcam

**Quadro 3.** Painel de marcadores imuno-histoquímicos

**Índice proliferativo (IP).** O índice proliferativo foi calculado a partir da quantificação da imunomarcação pelo Ki-67 considerando-se a contagem de 500 células tumorais em sítios com elevada imunopositividade (“hot spots”) (Mestrinho et al., 2017). Em associação, foi considerada a distribuição de expressão da proteína ao longo dos estratos do epitélio de revestimento.

**Avaliação da expressão de vimentina.** Foi pesquisada a presença de imunopositividade de ceratinócitos para a vimentina ao longo do tecido neoplásico, incluindo os brotamentos tumorais em sítios de invasão.

**Avaliação da expressão da fascina.** Foi empregado método qualitativo e semiquantitativo (Yamada et al., 2011), em 10 campos, com objetiva de 40X. Os campos selecionados para a análise foram os de maior intensidade e/ou porcentagem de células marcadas, distantes das margens do corte histológico, de modo a evitar marcações inespecíficas/artefatuais. Foram utilizadas como controle interno positivo as células endoteliais. Para determinação qualitativa (intensidade de coloração), preconizou-se o agrupamento dos tumores em 4 grupos: 0 = marcação ausente; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = intensa. Para a avaliação quantitativa, foi considerada porcentagem de área apresentando imunorreatividade, expressa da seguinte forma: 0 = marcação ausente; 1 = 1-25% da área apresentando positividade; 2 = 25-50% da área apresentando positividade; 3 = 50-100% de área apresentando positividade. Em sequência, as pontuações das avaliações qualitativa e quantitativa foram somadas, resultando

nos seguintes escores: 0 = marcação ausente; 2 - 3 = imunorreatividade fraca; 4 - 5 = imunorreatividade moderada; 6 = imunorreatividade intensa.

**Análise estatística.** Para a análise estatística foi utilizado o teste T de Student não-pareado, com  $p \leq 0,05$ , utilizando o software Microsoft Excel 365.

## Resultados

Os dados das amostras foram separados em dois grupos: papiloma e CEC oral, conforme resultado histopatológico, considerando-se localização, raça, idade e gênero (quadro 4). Os animais portadores de papilomas apresentaram-se no intervalo etário de 1 a 4 anos, sendo 3 fêmeas e 2 machos, sendo as lesões provenientes de pata, falange, pálpebra, lábio e gengiva. Já os carcinomas espinocelulares amostrados envolveram cães entre 6 e 16 anos de idade, sendo 5 fêmeas e 5 machos, predominando as formações gengivais (7/10).

Grupo	Registro	localização	Raça	Idade	Gênero
papiloma	H131052107	pata	dogue alemão	2	macho
papiloma	H104062107	lábio	pinscher	4	macho
papiloma	H128042106	gengiva	SRD	3	fêmea
papiloma	H113052204	falange	SRD	1	fêmea
papiloma	H113012108	pálpebra	SRD	2	fêmea
CEC	H114092002	palato	SRD	10	macho
CEC	H126032105	gengiva	SRD	6	macho
CEC	H116072110	gengiva	pequinês	13	fêmea
CEC	H123062111	sublingual	labrador retriever	13	macho
CEC	H120052206	gengiva	labrador retriever	7	macho
CEC	H109032203	gengiva	SRD	16	fêmea
CEC	H119112103	gengiva	SRD	14	fêmea
CEC	H115062102	palato	yorkshire terrier	-	macho
CEC	H122042203	gengiva	pastor alemão	6	fêmea
CEC	H103062202	gengiva	podengo português	11	fêmea

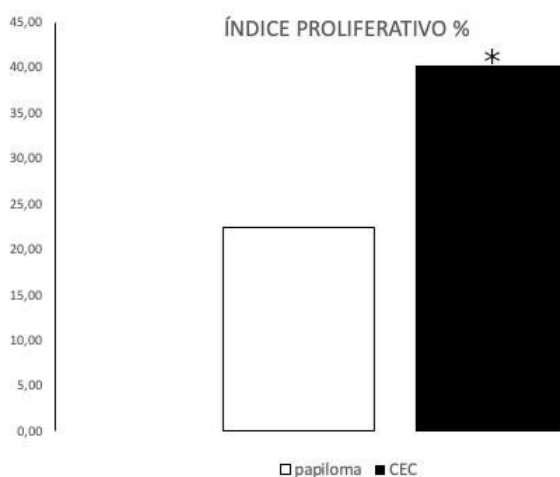
**Quadro 4:** Características dos animais avaliados, considerando-se localização, raça, idade, gênero e separação por grupo através do resultado histopatológico. (CEC: carcinoma espinocelular; SRD: Sem raça definida).

Os papilomas apresentaram crescimento exofítico, constituindo projeções superficiais associadas à expansão de população pleomórfica de ceratinócitos, com importante anisocariose e subversão da estratigrafia do epitélio escamoso. Um aspecto histopatológico fundamental foi a preservação da integridade da membrana basal em transição dermo-epidérmica, comprometida focalmente em apenas uma amostra frente a intenso infiltração leucocitária. Em contrapartida, no carcinoma espinocelular observou-se expansão de ceratinócitos pleomórficos, com importante aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose e macronúcleos. Presença de incremento mitótico com atipias, e eventuais pérolas córneas. Destaque para o estabelecimento de focos de descontinuidade da membrana basal e colonização de estratos subjacentes por células neoplásicas, dispostas em blocos de dimensões variáveis ou isoladamente. Em nossa amostragem predominaram lesões de grau intermediário ou elevado de malignidade, na dependência do protocolo de graduação histopatológico empregado (quadro 5).

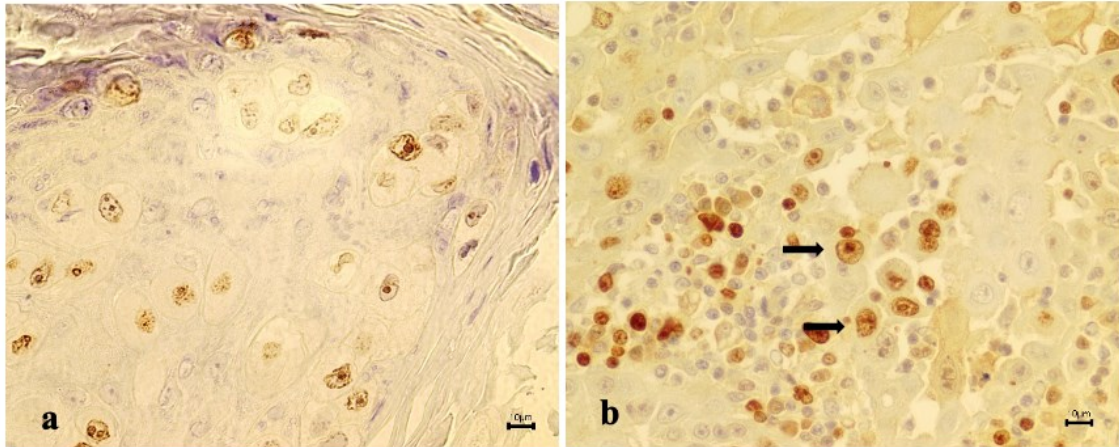
grupo	registro	gradação (fronteira) *	gradação (brotamentos) **	vimentina	índice proliferativo (%)	fascina-1
papiloma	H131052107	-	-	-	12,6	4
papiloma	H104062107	-	-	-	22	4
papiloma	H128042106	-	-	-	26,2	5
papiloma	H113012108	-	-	-	22,4	5
papiloma	H113052204	-	-	-	38,4	4
CEC	H114092002	II	III	+	38	6
CEC	H126032105	II	III	+	41,6	6
CEC	H116072110	I	II	-	30,1	5
CEC	H123062111	II	III	-	50	6
CEC	H120052206	II	III	+	30,4	6
CEC	H103062202	II	III	-	40,1	5
CEC	H109032203	II	III	-	44	5
CEC	H119112103	II	III	+	44,2	3
CEC	H115062101	II	II	-	42,3	5
CEC	H122042203	II	II	+	40,2	5

**Quadro 5:** Gradação histológica, expressão de vimentina, índice proliferativo e imunomarcações para fascina-1 nas amostras examinadas. (CEC: carcinoma espinocelular; SRD: Sem raça definida). \*Nagamine et al. 2017; \*\*Cerezo-Echevarria et al., 2020.

O índice proliferativo (IP) foi mensurado nas lesões papilomatosas e carcinomatosas, baseado na expressão de Ki-67 (figura 1). Nos papilomas foi identificada imunopositividade para além do estrato basal, atingindo ceratinócitos ao longo das projeções papilíferas (fig. 2a). Nestes o IP variou de 12,6% a 38,4%. A imunomarcação para o Ki-67 ocorreu ao longo dos agregados carcinomatosos, incluindo os nichos de invasão (fig. 2b), e o IP oscilou entre 30,1% a 50% das células avaliadas (quadro 5).



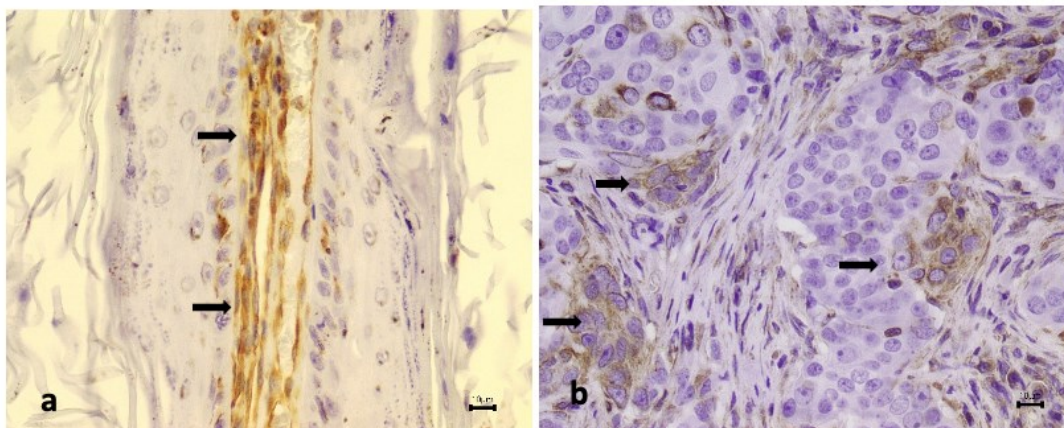
**Figura 1.** Gráfico apresentando o índice proliferativo nos grupos papiloma e CEC, com diferença estatisticamente significativa entre eles ( $p < 0,05$ , teste T de Student não-pareado).



**Figura 2.** Imunomarcção para o Ki-67.

- a. Fotomicrografia de corte histológico de papiloma exibindo imunopositividade nuclear para Ki-67 em ceratinócitos ao longo de toda a projeção papilífera.
- b. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma espinocelular evidenciando imunoexpressão nuclear para Ki-67 em população neoplásica invasora (setas).

Nas amostras de papiloma a imunomarcção para vimentina ficou restrita ao estroma dérmico subjacente (fig. 3a). Já nos CECs orais, foi possível a identificação de imunopositividade citoplasmática à vimentina em células neoplásicas infiltrantes em 50% das amostras, tanto na invasão por células isoladas como em células periféricas no contexto de blocos invasores (fig. 3b).

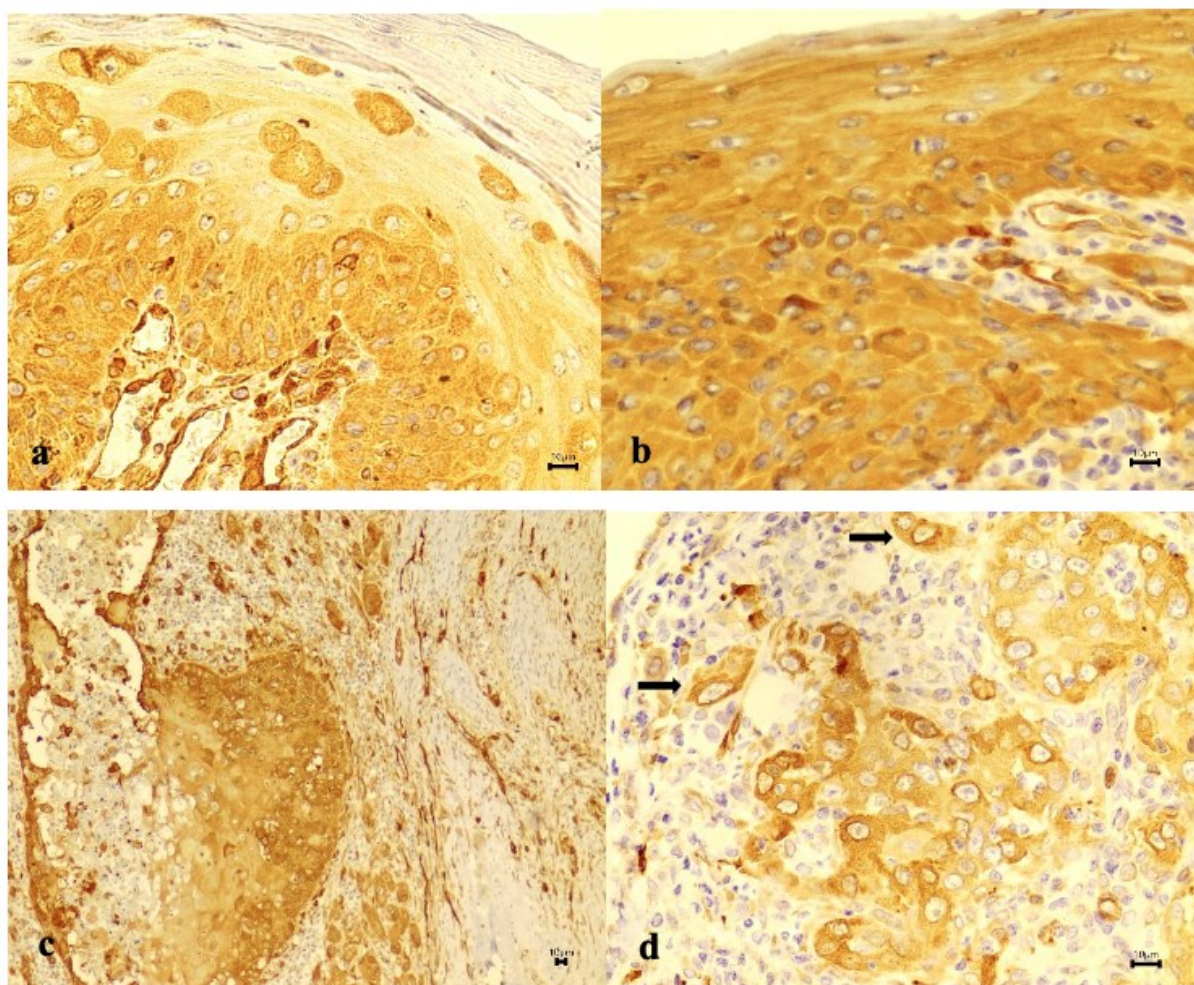


**Figura 3.** Imunomarcção para a vimentina.

- a. Fotomicrografia de corte histológico papiloma exibindo positividade para a vimentina restrita a componentes estromais dérmicos (setas).
- b. Fotomicrografia de corte histológico carcinoma espinocelular exibindo importante expressão citossólica em células epiteliais invasoras (setas).

A imunomarcção para a fascina-1 no tecido neoplásico mostrou-se citoplasmática e difusa, variando de leve a moderada, em comparação com o observado no endotélio local (fig. 4a/b). A intensidade da marcação varia em papilomas, sendo mais intensa nos compartimentos germinativo e suprabasilar (fig. 4a). Em carcinomas a imunopositividade, além do epitélio germinativo, tende a envolver todos os estratos da parede, com tendência à perda de intensidade à medida que é alcançada a superfície mucosa. Merece destaque a intensificação da marcação em sítios de invasão, tanto em blocos (fig. 4c) quanto em cordões ou isoladamente (fig. 4d).





**Figura 4.** Imunomarcção para a fascina-1.

- a. Fotomicrografia de corte histológico de papiloma apresentando imunopositividade citoplasmática para a fascina-1 em ceratinócitos neoplásicos. Gradação na intensidade da marcação sendo mais branda nos estratos superficiais do revestimento escamoso.
- b. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma espinocelular oral apresentando intensa imunopositividade citoplasmática para a fascina-1 em ceratinócitos neoplásicos ao longo de todos os estratos epiteliais mucosos.
- c. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma espinocelular apresentando imunopositividade citoplasmática para a fascina-1 em ceratinócitos neoplásicos ao longo de bloco invasor.
- d. Fotomicrografia de corte histológico de carcinoma espinocelular apresentando imunopositividade citoplasmática para a fascina-1 em ceratinócitos neoplásicos que invadem a derme em cordões ou isoladamente (setas).

## Discussão

Um dos desafios em patologia oncológica é a caracterização da agressividade neoplásica. Os protocolos de graduação histológica buscam cumprir essa função. Idealmente um bom sistema de graduação deve apresentar fácil aplicação e reprodutibilidade, além de informar sobre o comportamento biológico da neoplasia (Avallone et al., 2021). Os protocolos clássicos para CECs valorizam a diferenciação celular, sendo o grau de ceratinização na lesão neoplásica um parâmetro central (Goldschmidt & Goldschmidt, 2002). Neste estudo optou-se pelo emprego de protocolos de graduação histológica vinculados à avaliação da fronteira entre a lesão neoplásica e o tecido são, fundamentados por estudo com carcinomas espinocelulares orais em humanos que identificou alterações fenotípicas mais intensas em células tumorais nas áreas fronteiriças da lesão (Bryne et al., 1992). Nagamine et al., 2017, em estudo com CECs cutâneos e orais em cães, corroboraram esses achados, observando maior agressividade biológica nas lesões orais. Os critérios empregados para a graduação nos dois sistemas utilizados proporcionaram uma divergência entre a graduação, havendo uma tendência à indicação de maior grau quando admitidas, como parâmetro central, as características dos brotamentos tumorais, sendo 7 das 10 amostras de CECs compreendidas como de alto grau de malignidade, e 2 como de grau intermediário. Em contraposição, sendo o protocolo de Nagamine et. al., 2017, seriam 9 processos de grau intermediário de malignidade e 1 de baixo grau. Embora a aplicação do protocolo de Cerezo-Echevarria et. al., 2020, seja mais simples, dada a menor quantidade de parâmetros a serem avaliados, a ampliação na casuística avaliada associada ao acompanhamento da evolução dos animais será importante para a seleção do método que melhor reflete o comportamento biológico tumoral.

Embora a atividade proliferativa possa ser avaliada a partir da contagem mitótica, o emprego de marcadores de proliferação mostra-se mais fidedigno pois abarca as diferentes fases do ciclo celular, e não apenas o momento da divisão, sendo a imunomarcagem para o Ki-67 o recurso mais utilizado (Birajdar et al., 2014; Menon et al., 2019). A atividade proliferativa, como o indicado em literatura (Brodzki et al., 2014; Mestrinho et al., 2017; Takkem et al., 2018), em geral foi superior nas lesões carcinomatosas, sugerindo sua potencial contribuição no diagnóstico e prognóstico. A comparação do IP entre diferentes estudos é comprometida pelo emprego de diferentes técnicas para a quantificação do processo. Neste estudo optou-se pela pesquisa da expressão do Ki-67 em 500 células em áreas de maior positividade devido a sua frequente utilização na rotina diagnóstica (Mestrinho et al., 2017). Em consonância com a literatura, a distribuição da imunopositividade mostrou-se distinta entre as lesões, passando de predominantemente basal em lesões benignas para multifocal em carcinomas, com tendência à positividade em blocos invasores (Birajdar et al., 2014; Takkem et al., 2018). Apenas uma lesão de papiloma cursou com aumento da atividade proliferativa, em padrão focal, associada à resposta inflamatória crônica, havendo poucos relatos relacionando a expressão de Ki-67 e inflamação, como o de Tang et. al. (2018) em tireoide, sendo o mecanismo possivelmente atrelado à liberação local de fatores de crescimento (Kiraly et al., 2015). Além do sentido prognóstico, em situações específicas o índice proliferativo pode ser utilizado para caracterização histogênica tumoral, como na distinção entre ameloblastoma acantomatoso e carcinoma espinocelular oral em cães (Peralta et al., 2019). A pesquisa dos níveis séricos de Ki-67 tem sido investigada no sentido de contribuir para o diagnóstico de malignidades em cães (Estaller et al., 2022).

Um dos eventos ainda pouco explorados em termos diagnósticos e prognósticos, e relevante no processo de disseminação neoplásica é a chamada transição epitelial mesenquimal (TEM), um complexo processo biológico por meio do qual a célula epitelial adquire características que contribuem para a migração em meio ao estroma, presente durante eventos morfogênicos na vida intrauterina, no reparo de feridas e também no câncer (Guarino,



2007). Nesse sentido, a modulação da expressão de moléculas de adesão, relacionadas à coesão inerente às células epiteliais, fundamental em sua atribuição de “barreira” ou de compartimentalização tecidual, é um evento central na disseminação neoplásica. A E-caderina é uma das moléculas de adesão mais investigadas, estando a redução de sua expressão associada a pior prognóstico. Zhou et al., 2015, evidenciaram, em estudo com carcinomas espinocelulares orais humanos, progressiva redução na expressão de E-caderina de acordo com o grau de malignidade da lesão. Em CECs orais caninos, Mestrinho et al., 2015, identificaram relação entre expressão citoplasmática de E-caderina e maior grau histológico tumoral. Outro marcador clássico da TEM é a vimentina, um filamento intermediário que participa na constituição do citoesqueleto de células mesenquimais, como fibroblastos, células endoteliais e glias. Em contraste com a caderina, usualmente essa proteína não é expressa em células epiteliais (Satelli & Li, 2011). Segundo Danielsson et al., 2018, ela atua no suporte estrutural, na migração e na sinalização da célula neoplásica. Zhou et al., 2015, trabalhando com amostras de papilomas e carcinomas espinocelulares orais humanos, identificaram expressão de vimentina nas células neoplásicas malignas, nas quais a imunomarcagem ocorreu em 38,1% das lesões. À semelhança de nossos achados, nas lesões benignas não houve imunomarcagem e, nas malignas, a imunopositividade concentrou-se na periferia de blocos invasores. Furusawa et al., 2021, em estudo com neoplasias epiteliais de cães e gatos, evidenciaram imunopositividade para a vimentina em 2 lesões neoplásicas benignas, e nos 3 casos de CECs orais caninos avaliados. Comparativamente, dos 10 CECs orais que avaliamos, 5 (50%) foram identificadas células imunopositivas. Stone et al., 2016, relatam a expressão de vimentina por células epiteliais em processos inflamatórios e reparativos. Nesse sentido podemos considerar que a TEM, embora esteja relacionada a um maior risco de disseminação em condições neoplásicas, não pode, isoladamente, ser empregada como uma ferramenta para a distinção entre lesões reacionais ou neoplásicas, ou mesmo entre benignidade e malignidade. No entanto, em associação com informações clínicas e achados morfológicos sua caracterização agrega significado.

Nagamine et al., 2017, comparando CECs orais e cutâneos caninos, identificaram maior invasividade nos primeiros, associada à redução na expressão de moléculas de adesão, porém não foi encontrada diferença em relação à expressão de vimentina pelas células neoplásicas. Uma hipótese levantada pelos autores é de que, na TEM, a redução na expressão da E-caderina é precoce em relação à aquisição de positividade para a vimentina.

No sentido de agregar informações ao desenvolvimento da TEM em neoplasias epiteliais caninas, foi investigada neste estudo a expressão de fascina-1. Sua principal atividade está relacionada ao estabelecimento de ligações cruzadas entre filamentos de actina conferindo-lhes rigidez, o que favorece a emissão de lamelipódios, filopódios e a movimentação celular (Graner et al., 2017). Sun et al, 2014 mostraram uma correlação positiva entre a expressão de fascina e de fatores transcricionais envolvidos na TEM, como SNAI1, SNAI2, sugerindo a sua regulação através da TEM. O TGF $\beta$ , um importante indutor de TEM, estimula a expressão de fascina (Tayab et al, 2016). Em estudo de Noguchi et. al. (2022) feito *in vitro* com células de CECs de cães, houve redução da migração e do crescimento celular, a partir do bloqueio da síntese de fascina-1 pela FSCN1 siRNA, demonstrando que a fascina-1 está diretamente relacionada à progressão tumoral.

A participação da fascina-1 na carcinogênese do carcinoma espinocelular oral em humanos está bem caracterizada, associando-se à progressão tumoral via AKT e MAPK (Rodrigues et al., 2017). A hiperexpressão de fascina está relacionada ao menor tempo de sobrevida em portadores de vários tipos de câncer (Pelosi et al, 2003a/b; Puppa et al, 2007; Zhao et al, 2014). No entanto, existem relatos de sua presença em condições displásicas e estados pré-malignos. Assim, Chen et al. (2008), identificaram imunopositividade para a fascina-1 em

26% dos casos de adenoma tireoideano à semelhança do verificado em adenomas colorretais e papilomas sinonasais, lesões com potencial de evolução para a malignidade (Hashimoto et al, 2006; Wu et al, 2009). Avaliando a expressão de fascina-1 nas células neoplásicas em 130 portadores de CECs de laringe não foi caracterizada relação desta com características clínico-patológicas e tempo livre de doença (Ozturk et al., 2022).

Estudos relacionando fascina e câncer em animais são escassos. Yamada et al., 2011, evidenciaram a expressão de fascina-1 em lesões melanocíticas caninas, sendo tênue em melanocitomas e progressivamente mais intensa em melanomas mais agressivos, e assim como nesse estudo houve uma marcação no citoplasma de forma difusa nas células tumorais. Esta é a primeira abordagem acerca da expressão de fascina-1 em neoplasias de ceratinócitos de ocorrência natural em cães, sendo observada maior intensidade de imunomarcação em lesões malignas. A imunoposição nos ceratinócitos citoplasmáticos dos CECs caninos vista neste estudo converge com os achados de Gao (2012) em CECs de laringe em humanos. Merece destaque a modulação na imunopositividade da fascina-1 ao longo do epitélio escamoso, sendo predominante nos estratos inferiores em papilomas, e intensa e difusa ao longo de todas as camadas epiteliais em carcinomas orais. Esses achados guardam relação com as observações de Rodrigues et al. 2017, avaliando lesões hiperplásicas, displásicas e carcinomas em mucosa bucal humana. Por fim, a maior intensidade de marcação ocorreu nos ceratinócitos invasores.

As amostras com imunopositividade para a vimentina apresentaram paralelamente elevada expressão de fascina-1, corroborando as evidências da contribuição desses componentes no processo de TEM. Também exibiram elevada graduação histológica a partir da caracterização dos brotamentos tumorais, sugerindo seu envolvimento com a invasividade e disseminação neoplásicas. A ampliação da casuística, envolvendo lesões de diferentes graus histológicos e estádios clínicos e a inclusão de informações acerca da evolução dos animais são necessárias para esmiuçar a relação entre esses marcadores e o comportamento biológico dos CECs caninos, e sua possível validação como indicadores prognósticos nessas condições.

## Referências Bibliográficas

- Argyle, D.J., Blacking, T.M. 2008. From viruses to cancer stem cells: Dissecting the 529 pathways to malignancy. *The Veterinary Journal*,177, 311-323.
- Avallone, G., Rasotto, R., Chambers, J.K., Miller, A.D., Behling-Kelly, E., Monti, P., Berlato, D., Valenti, P., Roccabianca, P. 2021. Review of Histological Grading Systems in Veterinary Medicine. *Veterinary Pathology*, 58:809-828.
- Belluco, S., Brisebard, E., Watrelot, D., Pillet, E., Marchal, T., 2013. Ponce, F. Digital squamous cell carcinoma in dogs: epidemiological, histological, and immunohistochemical study. *Veterinary Pathology*, Nov:1078-82.
- Birajdar, S.S., Radhika, Mb., Paremala, K., Sudhakara, M., Soumya, M.Gadivan, M. 2014. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. PMID: 25328294 PMCID: PMC4196282. < <https://doi.org/10.4103/0973-029X.140729>>
- Brodzki, A., Lopuszynski, W., Brodzki, P., Tatar, M.R. 2014. Diagnostic and prognostic Value of Cellular Proliferation Assessment with ki-67 Protein in Dogs Suffering from benign and Malignant Perianal Tumours. *Folia Biologica Kraków*, v.62. < [https://doi.org/10.3409/fb62\\_3.235](https://doi.org/10.3409/fb62_3.235)>
- Bryne, M., Hanna, S. K., Lilleng, R., Kjerheim, A. 1992. Malignancy Grading of the Deep Invasive Margins of Oral Squamous Cell Carcinomas has high Prognostic value. *Journal of Pathology*, vol. 166: 375-381.
- Catalano, V., Turdo, A., Di Franco, S., Dieli, F., Todaro, M., Stassi, G. 2013. Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay. *Seminars in Cancer Biology*, vol.23, 522-32.
- Cerezo-Echevarria, A., Grassinger, J.M., Beitzinger, C., Klopffleisch, R., Aupperle-Lellbach, H. 2020. *Veterinary Science*, 8. < <https://doi.org/10.3390/vetsci8010003> >
- Chen, G., Zhang, F., Ren, J., Tao, L., Shen, Z., Lv, Z., Yu, S., Dong, B., Xu, L. LI, E. 2008. Expression of fascin in thyroid neoplasms: a novel diagnostic marker. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 134:947–51.
- Das, V., Bhattacharya, S., Chikkaputtaiah, C., Hazra, S., Pal, M. 2018. The basics of epithelial – mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. *Journal of Cell Physiology*, 1-21.
- Danielsson, F.; Peterson, M.K.; Araujo, H.C.; Lautenschlager, F.; Gad, A.K.B. 2018. Vimentin Diversity in Health and Disease. *Cells*, 7, 147.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., Mcintosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., Hartwell, L. 2003. The Case for Early Detection. *Nature Reviews Cancer*, 3, 243-252.
- Estaller, A., Kessler, M., Wehrend, A., Hirschberger, J., Neumann, S. 2022. Utility of Serum Ki-67 as a Marker for Malignancy in Dogs. *Animals (Basel)*. May 14; 1263. <<https://doi.org/10.3390/ani12101263>>
- Furusawa, Y., Takahashi, M., Shima-Sawa, M., Hatai, H., Miyoshi, N., Yamato, O., Yabuki, A. 2021. Immunocytochemical evaluation of epithelial-mesenchymal transition in epithelial tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*. Sep 3, 1363-1368. < <https://doi.org/10.1292/jvms.21-0021> >
- Gao, W; Zhang, C; Feng, Y; Chen, G; Wen, S; Huangfu, H; Wang, B. 2011. Fascin-1, Erzin and Paxilin Contribute to the malignant progression and are predictors of Clinical Prognosis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*, 7, Issue11.
- Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. 2007. *International Journal of Biochemistry Cell Biology*, v. 39, p. 2153-60.
- Goldschmidt, M.H. & Goldschmidt, K.H. 2002. Epithelial and melanocytic tumors of skin. In. Meuten D.J. *Tumors in Domestic Animals*, 5th ed.
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 646–674.

- Hashimoto, Y., Skacel, M., Lavery, I.C., Mukherjee, A.L., Casey, G., Adams, J.C. 2006. Prognostic significance of fascin in advanced colorectal cancer: an immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. *BMC Cancer*, 241–51.
- Head, K.W., Cullen, J.M., Dubielzig, R.R., Else, R.W., Misdorp, W., Patnaik, A.K., Tateyama, S., Van Der Gaag, I. 2003. World Health Organization, International Histologic Classification of Tumors of Domestic Animals, Histological Classification of Tumors of the Alimentary System of Domestic Animals. Second series, Vol 5. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology American Registry of Pathology.
- Ivaska, J., Pallarib, H-M., Nevoa, J., Eriksson, J. E. 2007. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research*, v313, 2050-62.
- Kiraly, O., Gong, G., Olipitz, W., Muthupatani, S., Engelward, B.P. 2015. Inflammation-induced cell proliferation potentiates DNS damage-induced mutations *in vivo*. *PLoS Genet.*, 11: e1004901
- Lambert, R., Sauvaget, C., de Camargo Cancela M., Sankaranarayan, R. 2011. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23, 633-64.
- Liptak, J. M.; Withrow, S. J. 2007. Cancer of the gastrointestinal tract – Oral Tumors. In: VAIL, D.M.; WITHROW, S.J. Small Animal – Clinical Oncology. 4. ed. Canada: Saunders Elsevier. p. 455-473.
- Liu, S., Liu, L., Ye, W., Ye, D., Wang, T., Guo, W. Liao, Y., Xu, D., Song, H., Zhang, L., Zhu, H., Deng, J., Zhang, Z. High. 2016. Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Scientific Reports*; 38834.
- Lo, U-G., Lee, C.F., Lee, M.S., Hsieh, J.T. 2017. The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*. v18,2079. <<https://doi.org/10.3390/ijms18102079> >
- Marreta, S. M., 2001. Recognition and Treatment of Oral Tumors. Atlantic Coast Veterinary Conference.
- Medleau, L.; Hnilica K. A. Papilomatose. 2009. *Dermatologia de pequenos animais – Atlas colorido e guia terapêutico*. 2 ed. São Paulo: Roca, p.141 – 142.
- Menon, S.S., Guruvayoorappanb, C., Sakthivel, K.M., Rasmi, R.R. 2019. Ki-67 protein as a tumour proliferation marker. *Clínica Chimica Acta*, 491, 39–45.
- Mestrinho, L.A., Pissarra, H., Carvalho, S., Peleteiro, M.C., Gawor, J., Niza, M.M.R.E. 2017. Comparison of Histological and Proliferation Features of Canine Oral Squamous Cell Carcinoma Based on Intraoral Location: 36 Cases. *Journal of Veterinary Dentistry*. Jun, 92-99. <<https://doi.org/10.1177/0898756417713979>> PMID: 28631549.
- Mestrinho, L.A., Pissarra, H., Faisca, P.B., Bragança, M., Peleteiro, M.C., Niza, M.M. 2015. P63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Pathology*, Jul, v52, 614-20. <<https://dx.doi.org/10.1177/0300985814547391>>
- Meuten, D.J. 2002. *Tumors in Domestic Animals*. 5ed. Willey Blackwell.
- Monteiro, V. L. C.; Coelho, M. C. O. C. 2008. Thuya occidentalis e papilomatose. *Brazilian Homeopathic Journal*, v. 10, n. 1, p. 16-21.
- 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 p.783-791.
- Noguchi, S.; Tanimoto, N.; Nishida, R.; Matsui, A. 2022. Functional analysis of the miR-145/Fascin1 cascade in canine oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases, Leading in Oral, Maxillofacial, Head & Neck Medicine*. Fev.

- Öztürk, Ç., Pasaoglu H.E., Emre, F., Tetikkurt, Ü.S., Şentürk, Ege, T.S. 2022. Do immunohistochemical studies have a role in predicting prognosis of laryngeal squamous cell carcinomas? CD44 and Fascin experience. *Acta Biomedica*, Jan 19;92(6). < <https://doi.org/10.23750/abm.v92i6.10432>>
- Pang, L.Y., Argyle, D.J. 2009. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792, 380-391.
- Pelosi, G., Pasini, F., Fraggeta, F., Pastorino, U., Iannucci, A., Maisonneuve, P., Arrigoni, G., De Manzoni, G., Bresola, E. & Viale, G. 2003. Independent value of fascin immunoreactivity for predicting lymph node metastases in typical and atypical pulmonary carcinoids. *Lung Cancer*, 42, 203-213.
- Pelosi, G., Pastorino, U., Pasini, F., Maisonneuve, P., Fraggeta, F., Iannucci, A., Sonzogni, A., De Manzoni, G., Terzi, A., Durante, E., Bresola, E., Pezzella, F., Viale, G. 2003. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage I non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*, 88, 537-547.
- Peralta, S., Grenier, J.K., McCleavy-Wheeler, A., Duhamel, G.E. 2019. Ki-67 Labelling Index Of Neoplastic Epithelial cells Differentiates Canine Acanthomatous Ameloblastoma from Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*. 171: 59-69. < <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.08.001>>.
- Puppa, G., Maisonneuve, P., Sonzogni, A., Masullo, M., Chiappa, A., Valerio, M., Zampino, M.G., Franceschetti, I., Capelli, P., Chilosi, M., Menestrina, F., Viale, G., Pelosi, G. 2007. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage III/IV colonic adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, 96, 1118-1126.
- Quinn, C.M.; Wright, N.A. 1990. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and application as prognostic variables. *Journal of Pathology*, Chichester, v.160, p.93-102.
- Requicha, J.F., Pires, M.A., Albuquerque, C.M., Viegas, C.A. 2015. Neoplasias da cavidade oral do cão - Breve revisão. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 41-46, jan/mar.
- Rodrigues, P.C., Sawazaki-Calone, I., Ervolino O. C., Soares, M. C.C., Dourado, M.R., Cervigne, N.K., Migue, M.C., Ferreira, C. A., Lambert, D.W., Graner, E., Silva, S.D., Jamali, M.A.A., Leme, A.F.P., Salo, T.A., Coletta, R.D. 2017. Fascin promotes migration and invasion and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 74736-74754.
- Satelli, A., Li, S. 2011. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v68, 3033-46. < <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>> PMID: 21637948; PMCID: PMC3162105.
- Scholzen, T.; Gerdes, J. 2000. The Ki-67 Protein: from the known and the unknown. *Journal Of Cellular Physiology*, 182:311-322.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jema, A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 65, 5-29.
- Souza, T.M.; Figuera, R.A.; Irogoyen, L.F. 2006. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*, v.36, p.555-560.
- Stone, R.C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K.I., Tomic-Canic, M. 2016. Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 495-506. <<https://doi.org/10.1007/s00441-016-2464-0>> PMID: 27461257; PMCID: PMC5011038.
- Sun, J., He, H., Pillai, S., Xiong, Y., Challa, S., Xu, L., Challappan, S. & Yang, S. 2013. GATA3 transcription factor abrogates Smad4 transcription factor-mediated fascin overexpression, invadopodium formation, and breast cancer cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 36971- 36982.
- Tan, V.Y., Lewis, S.J., Adams, J.C., Martin, R.M. 2013. Association of fascin-1 with mortality, disease progression and metastasis in carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine Journal*, v11.
- Tang, J., Gui, C., Qiu, S., Wang, M. 2018. The Clinicopathological significance of ki-67 in papillary thyroid carcinoma: a suitable indicator? *World Journal of Surgical Oncology*. <<https://doi.org/10.1186/s12957-018-1384-8>>

- Tanaka, M., Kijima, H., Shimada, H., Makuuchi, H., Ozawa, S., Inokuchi, S. 2015. Expression of podoplanin and vimentin is correlated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 12: 4029-36.
- Taiyab, A., Korol, A., Deschamps, P.A., & West-Mays, J.A. 2016. b-Catenin/CBP-dependent signaling regulates TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57, 5736–5747.
- Todoroff, R.J., Brodrey, R.S. 1979. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175, 567-571.
- Usman, S., Waseem, N.H., Nguyen, T.K.N., Mohsin, S., Jamal, A., Teh M.T., Waseem, A. 2021. Vimentin Is at the Heart of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) Mediated Metastasis. *Cancers (Basel)*. Oct 5, 4985. <<https://doi.org/10.3390/cancers13194985>>. PMID: 34638469; PMCID: PMC8507690.
- Wu, H.H., Zafar, S., Huan, Y., Yee, H., Chiriboga, L., Wang, B.Y. 2009. Fascin over expression is associated with dysplastic changes in sinonasal inverted papillomas: a study of 47 cases. *Head and Neck Pathology*, 212-6. <<https://doi.org/10.1007/s12105-009-0133-2>>. PMID: 20596974; PMCID: PMC2811625.
- Yamada, N., Mori, T., Murakami, M., Noguchi, S., Sakai, H., Akao, Y., Maruo, K. 2011. *Veterinary and Comparative Oncology*, <<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00300.x>>
- Zhou, J., Tao, D., Xu, Q., Gao, Z., Tang, D. 2015. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, Mar 3150-4. PMID: 26045832; PMCID: PMC4440141.
- Zhao, X., Gao, S., Ren, H., Sun, W., Zhang, H., Sun, J., Yang, S. & Hao, J. 2014. Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin bundling protein fascin. *Cancer Research*, 74, 2455–2464.