

Guia de Coleta de Dados de Carcinoma de Células Escamosas Ocular (CCEO)



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sul
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos147

Guia de Coleta de Dados de Carcinoma de Células Escamosas Ocular (CCEO)

*Alessandro Pelegrine Minho
Angélica Cavalheiro Bertagnolli
Emanuelle Baldo Gaspar
Robert Domingues
Fernando Flores Cardoso*

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

BR 153, Km 633. Caixa postal 242

96401-970 - Bagé – RS

Fax: 55 53 3240-4650

<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Claudia Cristina Gulias Gomes*

Secretária-Executiva: *Graciela Olivella Oliveira*

Membros: *Estefanía Damboriarena, Fernando Flores Cardoso, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Bassols Brisolara, Marco Antônio Karam Lucas, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñé*

Supervisor editorial: *Lisiane Brisolara*

Revisor de texto: *Fernando Goss*

Normalização bibliográfica: *Graciela Olivella Oliveira*

Tratamento de ilustrações: *Núcleo de Comunicação Organizacional*

Editoração eletrônica: *Núcleo de Comunicação Organizacional*

Foto(s) da capa: *Alessandro Pelegrine Minho*

1ª edição

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sul

Guia de coleta de dados de carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) / Alessandro Pelegrine Minho ...[et al.]. -- Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015.
(Documentos / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1982-5390 ; 147)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web: <www.embrapa.br>

Título da página da Web (acesso em 31 ago. 2015).

1. Bovino. 2. Doença animal. 3. Olho. 4. Neoplasia. I. Minho, Alessandro Pelegrine. II. Título. III. Série.

CDD 636.089771

Autores

Alessandro Pelegrine Minho

Médico Veterinário, Doutor em Ciências, pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, BR 153 Km 633, CEP 96401-970 - Bagé, RS - Brasil

Angélica Cavalheiro Bertagnoli

pesquisadora IV Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF , Estrada Municipal do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS - Brasil

Emanuelle Baldo Gaspar

Médica Veterinária, Doutora em Microbiologia e Imunologia, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, BR 153 Km 633, CEP 96401-970 - Bagé, RS - Brasil

Robert Domingues

Biólogo, Mestre em Genética e Melhoramento,
Analista da Embrapa Pecuária Sul, Caixa
Postal 242, BR 153 Km 633, CEP 96401-970,
Bagé, RS - Brasil

Fernando Flores Cardoso

Médico Veterinário, Doutor (Ph.D.) em
Bioinformática -
ênfase em Estatística Genômica, pesquisador da
Embrapa Pecuária Sul,
Caixa Postal 242, BR 153 Km 633,
CEP 96401-970 - Bagé, RS – Brasil

Apresentação

As publicações técnicas da Série Embrapa são importantes veículos de informação, destinada a produtores, técnicos, empresários do agronegócio, pesquisadores, estudantes e público em geral interessados nas tecnologias desenvolvidas pela Empresa e seus colaboradores. Trata-se de publicações com distintas características, objetivos e público alvo, tais como: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; Documentos; Circular Técnica; Comunicado Técnico; Sistemas de Produção; Livro e outros.

A Embrapa Pecuária Sul utiliza este veículo para comunicar suas tecnologias produzidas, recomendações, práticas agrícolas e resultados de pesquisa e desenvolvimento, direcionando ao público interessado informações ligadas à produção de forrageiras e pastagens, bovinocultura de corte e leite e ovinocultura dos campos sulbrasilieiros. É com satisfação que oferecemos mais esta obra, destacando recente trabalho desenvolvido pelo Centro da Embrapa, em Bagé, em benefício à sustentabilidade da pecuária sulina.

Esta publicação da Série Embrapa é um guia prático para a identificação, coleta de amostra, análise e confirmação do Carcinoma de Células Escamosas Ocular (CCEO- câncer do olho) que é uma designação generalista de um tumor primário de queratinócitos, com ocorrência mais comum em bovinos, as quais emergem a partir de tecidos oculares, especialmente das pálpebras. Este guia prático pode auxiliar produtores e técnicos a identificar o problema em rebanhos, assim como auxiliar nas estratégias de seleção, buscando

aqueles animais geneticamente menos susceptíveis à manifestação do CCEO.

Esperamos que os leitores desfrutem deste Documento e sugerimos que, em caso de maior interesse no tema abordado ou necessidades de esclarecimentos, realizem o contato com nosso setor de atendimento ao cliente (SAC), acessando <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/> ou pelo fone (53) 3240-4650. A Embrapa terá o máximo prazer em atendê-lo.

Alexandre Varella
Chefe-Geral

Sumário

Introdução.....	08
Metodologia de coleta de material.....	10
Referências.....	14
Anexos.....	18

Guia de Coleta de Dados de Carcinoma de Células Escamosas Ocular (CCEO)

Alessandro Pelegrine Minho
Angélica Cavalheiro Bertagnolli
Emanuelle Baldo Gaspar
Robert Domingues
Fernando Flores Cardoso

Introdução

Carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) é uma designação generalista de um grupo de neoplasias (tumores) primárias de queratinócitos, as quais emergem a partir de tecidos oculares, especialmente das pálpebras e, particularmente, da terceira pálpebra. Em bovinos, o CCEO é diagnosticado em todo o mundo, com alta prevalência em rebanhos de raças europeias. É o tumor mais comum em bovinos, o que faz com que seja a neoplasia que acarreta as perdas econômicas mais significativas (DENNIS et al., 1985). Apesar de onerosa, a opção por tratamento cirúrgico é uma alternativa que, geralmente, obtém êxito, desde que seguidas normas básicas de antisepsia e cuidados pós-operatórios.

Embora seja um tumor comum, a gênese do CCEO não foi totalmente investigada. Não obstante, há ampla evidência de que a exposição à luz ultravioleta (UV) é o principal fator de risco epidemiológico para o

desenvolvimento de carcinoma de células escamosas da pele em humanos (GREEN; BATTISTUTA, 1990) e em animais (GROSS et al., 1992). A prevalência do CCEO está diretamente relacionada com a exposição à luz ultravioleta (UV). Assim como outros agentes cancerígenos, a radiação UV causa mutação em genes relacionados ao aparecimento de tumores (oncogenes). Por exemplo, mutações específicas nos genes ou regiões moduladoras de expressão das proteínas p53 e ki67 são relacionadas ao desencadeamento de processos cancerígenos (AZARABAD et al., 2011; GAMBLIN et al., 1997; ORAM et al., 1994).

Nos bovinos, o CCEO é mais comum em animais idosos, em que a prevalência etária de pico ocorre em torno dos sete a oito anos. Esse tipo de tumor é mais comumente encontrado em áreas sem pigmento da região periocular (ANDERSEN; BADZIOCH, 1991), uma vez que a melanina desempenha uma importante função fotoprotetora. Na raça Hereford, a prevalência é maior por ser comumente utilizada na criação extensiva e apresentar a cara branca, tipicamente na região periocular. Portanto, a seleção para pele periocular pigmentada pode reduzir a ocorrência desse tumor. Em relação à predisposição racial, alguns trabalhos, como Cena e Monteith (1975) e McArthur (1987), citam as raças Hereford e Holandês, entre outras, como predispostas a CCEO, também devido à baixa pigmentação ocular. Em suma, a excessiva exposição aos raios UV e a ausência de pigmentação na região periocular dos animais são os dois maiores fatores predisponentes para a ocorrência de CCEO (câncer de olho) em todas as raças bovinas (HEENEY; VALLI, 1985; NEWTON et al., 1996).

A fenotipagem e genotipagem de animais Hereford com e sem pigmentação na região periocular pode auxiliar na identificação de marcadores moleculares de interesse [Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)] relacionados à proteção contra a manifestação do câncer de olho em bovinos. Além disso, a comparação entre animais Hereford com e sem CCEO mantidos nas mesmas condições de criação e, quando possível, com grau de parentesco elevado, pode propiciar a identificação de genes candidatos relacionados ao aparecimento do câncer ocular em bovinos. Concomitante a essas análises, o estudo da associação entre marcadores relacionados à pigmentação

periocular e ao desenvolvimento de CCEO favorecerá estratégias de seleção daqueles animais geneticamente menos susceptíveis à manifestação do carcinoma de células epidermoides ocular (CCEO - câncer de olho). Nesse sentido, a criteriosa coleta de dados fenotípicos torna-se crucial para que equações de predição e estudos de associação possam ser desenvolvidos com fidedignidade.

O objetivo deste documento é definir a metodologia para coleta de material biológico e de informações relevantes que caracterizem manifestações de CCEO e, portanto, possibilitem estudos na área de genômica, relacionados ao CCEO, em bovinos da raça Hereford.

Metodologia de coleta de material

Para que se possa estudar a associação entre a manifestação clínica de CCEO e o genoma bovino, é importante que para cada animal com manifestação clínica de CCEO, seja também incluído um animal controle mantido no mesmo lote (se possível, com algum grau de parentesco). Desta forma, garante-se que ambos estão expostos ao mesmo sistema de produção e sob a influência dos mesmos fatores externos tais como dieta e exposição aos raios solares. Em se tratando de uma característica de alta complexidade genética, de baixa herdabilidade (RUSSEL et al., 1976) e com prevalência no rebanho normalmente baixa (máximo 5%), a realização desse estudo "caso-controle" requer o maior número de amostras possível dos animais com manifestação clínica.

Tipos de amostras necessárias para o estudo: biópsias dos tumores para confirmar o diagnóstico e sangue ou pelo dos animais doentes (casos) e de um contemporâneo sadio (controle negativo) para extração do DNA:

- **Biópsia do tumor**

Para que se tenha a confirmação de que a doença é CCEO, é importante realizar biópsia do tumor em todos os animais com tal manifestação e enviar as mesmas a um laboratório qualificado para análise. Depois de coletada,

a biópsia deve ficar armazenada em solução de formaldeído a 10% tamponada com fosfato de sódio monobásico e bibásico, com pH 7,0 até a análise.

• **Sangue**

Coletar 4 mL de sangue periférico em tubos de coleta de sangue a vácuo com EDTA, com cuidado para não haver contaminação. A amostra de sangue deve ser coletada no caso de touros reprodutores em que se procederá o sequenciamento do genoma dos indivíduos.

• **Pelo**

Coletar pelo proveniente da cauda dos animais, conforme descrito por Salman e Laureano (2006). Aproximadamente 30 bulbos pilosos já fornecem material genético suficiente. A amostra de pelo deve ser coletada no caso de animais comerciais (machos e fêmeas), os quais serão genotipados com chips de SNPs de baixa densidade. Paralelamente, será realizado um estudo mais aprofundado com touros pais que tiveram ampla difusão na raça, utilizando a técnica de sequenciamento do genoma (determinação de todos os pares de base da sequência do genoma e não somente em marcadores pré-definidos). Como esta técnica necessita de maior quantidade de DNA genômico, deve-se coletar 4 mL de sangue periférico em tubos de coleta de sangue a vácuo com EDTA, com cuidado para não haver contaminação.

A identificação e o registro dos animais com sintomas de CCEO (Figura 1) (caso), bem como dos animais sem lesão (controle negativo), devem ser realizadas por meio de uma "Ficha de Registro" específica para cada propriedade (Anexo 1) e pelo "Formulário de Coleta de Carcinoma" (Anexo 2). A cirurgia para coleta do tecido tumoral ocular deve ser realizada por um médico veterinário, que também é o responsável pelo preenchimento do "Formulário de Coleta de Carcinoma" (Anexo 2), uma vez que esse contém informações técnicas sobre o aspecto do tumor. Nesse mesmo formulário, devem ser registrados dados de dois animais: (i) do animal com lesão (caso) e (ii) do outro animal sem lesão, o qual foi criado nas mesmas condições de manejo (controle negativo). A comparação do DNA dos animais com e sem sintomas aumentará as chances de identificação de marcadores moleculares relacionados à patologia (CCEO).

Foto: Alessandro P. Minho



Figura 1: Foto de bovino com Carcinoma de Células Epidermoides Ocular (CCEO).

Cada criador ou profissional vinculado à raça Hereford deve receber um "kit de coleta" (Figura 2) composto por: frasco de plástico com formol tamponado para armazenar o tecido tumoral coletado, etiquetas de identificação do frasco, lápis para escrever na etiqueta (a etiqueta pode ser inserida dentro do frasco com formol, por isso deve ser identificada a lápis) e cartões de coleta de pelo (próprios / específicos para extração do DNA do animal), além do formulário de coleta de carcinoma e da ficha de registro.

Foto: Alessandro P. Minho

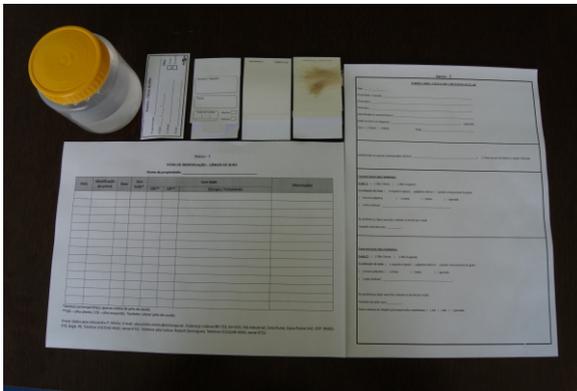


Figura 2: Kit de coleta de tecido tumoral (CCEO): A: frasco com formol tamponado; B: etiqueta de identificação do frasco; C, D e E: modelo de cartão para coleta de pelo (fechado, aberto vazio e aberto com amostra, respectivamente); F: formulário de coleta de carcinoma; E: ficha de registro dos animais.

É altamente recomendável que seja realizado o registro fotográfico das lesões oculares (CCEO) concomitante à coleta de material (tecido ocular). Para isso, ao lado de cada olho comprometido, alguém deverá segurar um cartão contendo: identificação do animal, data e "O.D." (para olho direito) ou "O.E." (para olho esquerdo) (Figura 3). A foto pode ser enviada por e-mail para a mesma instituição/laboratório para o qual será enviada a biópsia acompanhada do "Formulário de Coleta de Carcinoma" preenchido e anexado (Anexo 2).

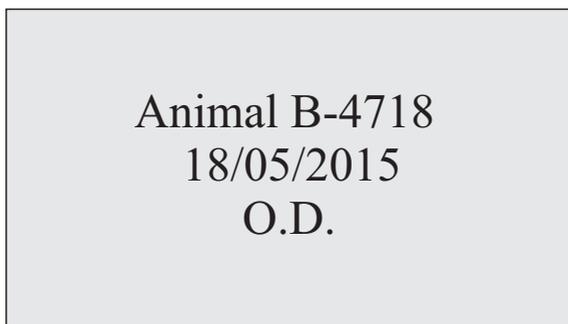


Figura 3: Esquema de cartão de identificação para registro fotográfico da lesão (CCEO).

Todos os frascos, acompanhados das fichas de identificação e cartões com pelos (animal com sintoma e animal sem manifestação de CCEO), serão enviados para a Embrapa Pecuária Sul (CPPSul) para conferência e encaminhamento do tecido ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) para confirmação histopatológica. No caso da coleta de material dos touros formadores de rebanho, ao invés do cartão com pelos, será enviado o tubo com sangue total.

O material coletado (tecido) será encaminhado pelo CPPSul para o IPVDF para confirmação do diagnóstico de carcinoma de células epidermóides por meio de diagnóstico histopatológico, no qual são detectadas as alterações características das lesões. O material para avaliação do DNA (pelo ou sangue) será armazenado até análise.

Referências

- ANDERSEN, D. E.; BADZIOCH, M. Association between solar radiation and ocular squamous cell carcinoma in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 784-788, May 1991.
- AZARABAD, H.; GHARAGOZLOU, M. J.; NOWROUZIAN, I.; SEYEDJAVAD, M. R. P53 and Ki67 protein expression in ocular squamous cell carcinomas of dairy cattle. **International Journal of Veterinary Research**, v. 5, n. 4, p. 226-231, 2011.
- CENA, K.; MONTEITH, J. L. Transfer processes in animal coats. I. Radiative transfer. **Proceedings of the Royal Society of London: Series B, Biological sciences**, v. 188, p. 377-393, Mar. 1975.
- DENNIS, M. W.; LUEKER, D. C.; KAINER, R. A. Host response to bovine ocular squamous cell carcinoma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 9, p. 1975-1979, 1985.
- GAMBLIN, R. M.; SAGARTZ, J. E.; COUTO, G. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 8, p. 857-863, Aug. 1997.
- GREEN, A.; BATTISTUTA, D. Incidence and determinants of skin cancer in high-risk Australian population. **International Journal of Cancer**, v. 46, n. 3, p. 356-361, Sept. 1990.
- GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J. **Veterinary dermatopathology: a macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. 520 p.
- HEENEY, J. L.; VALLI, V. E. Bovine ocular squamous cell carcinoma: an epidemiological perspective. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, n. 1, p. 21-26, 1985.

McARTHUR, A. J. Thermal interaction between animal and microclimate: a comprehensive model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 126, n. 2, p. 203-238, May 1987.

NEWTON, R.; FERLAY, J.; REEVES, G.; BERAL, V.; PARKIN, D. M. Effect of ambient solar ultraviolet radiation on incidence of squamous-cell carcinoma of the eye. **The Lancet**, v. 347, n. 9013, p. 1450-1451, May 1996.

ORAM, Y.; ORENGO, I.; BAER, S. C.; OCAL, T. P53 protein expression in squamous cell carcinomas from sun-exposed and non-sun-exposed sites. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 417-422, Sept. 1994.

RUSSELL, W. C.; BRINKS, J. S.; KAINER, R. A. Incidence and heritability of ocular squamous cell tumors in Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 1156-1162, 1976.

SALMAN, A. K. D.; LAUREANO, M. M. M. **Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pêlo de bovinos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. 7 p. (Embrapa Rondônia. Circular técnica, 87).

Anexos

Anexo - 1

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO – CÂNCER DE OLHO

Nome da propriedade: _____

Data	Identificação do animal	Sexo	Sem lesão *	Com lesão		
				OD **	OE **	Cirurgia / Tratamento

* Animal contemporâneo, apenas coleta de pelo da cauda.

** OD – olho direito / OE – olho esquerdo. Também coletar pelo da cauda.

Enviar dados para Alessandro P. Minho. E-mail: alessandro.minho@embrapa.br.

Endereço rodovia BR-153, Km 633, Vila Industrial, Zona Rural, Caixa Postal 242, CEP: 96401-970, Bagé, RS; Telefone (53)3240-4650, ramal 4762. Telefone alternativo: Robert Domingues; Telefone (53)3240-4650, ramal 4752

Anexo - 2

FORMULÁRIO: COLETA DE CARCINOMA OCULAR

C:\s\9***************

Propriedade / Fazenda: _____

Proprietário: _____

Município: _____

Identificação do animal (brinco): _____

Idade em anos (ou categoria): _____ () Ignorado

Sexo: () Fêmea () Macho Raça: _____

Identificação do animal contemporâneo (brinco): _____ () Coleta de pelo da cauda ou sangue realizada

Dbsduf s{b→pleb)t *frt *p} ft *

Lesão 1: ' (Nlgn Ctp|sn ' (Nlgn Drpt dcpn

Mpobj{b→pleb|frt *p9' (bnnt mslu` k'sdq'k' (oc|odaq` hmedqng' (it m' "n bnqndr bldq'kcn f klan

() terceira pálpebra () córnea () limbo () ignorado

() outra (indicar): _____

De preferência, fazer uma foto e anexar ou enviar por e-mail. Descrever se há pigmentação da região periocular na ausência de foto.

Tamanho da lesão (cm): _____.

Dbsduf s{b→pleb)t *frt *p} ft *

Lesão 2: ' (Nlgn Ctp|sn ' (Nlgn Drpt dcpn

Mpobj{b→pleb|frt *p9' (bnnt mslu` k'sdq'k' (oc|odaq` hmedqng' (it m' "n bnqndr bldq'kcn f klan

() terceira pálpebra () córnea () limbo () ignorado

() outra (indicar): _____

De preferência, fazer uma foto e anexar ou enviar por e-mail. Descrever se há pigmentação da região periocular na ausência de foto.

Tamanho da lesão (cm): _____.

Outros animais do rebanho já tiveram lesões semelhantes: () sim () não () ignorado.

CONSIDERAÇÕES GERAIS E ROTEIRO DE COLETA DE MATERIAL - (CARCINOMA OCULAR)

- Assim que identificarem lesões suspeitas de carcinoma ocular nos bovinos os responsáveis pelos animais deverão enviar um e-mail para a Embrapa Pecuária Sul, para solicitar o envio de "kits de coleta", nos endereços eletrônicos: robert.domingues@embrapa.br e alessandro.minho@embrapa.br. Telefone: (53) 3240-4650 ramal 4752.
- Em princípio, os carcinomas serão retirados (extirpados) pelos médicos veterinários que prestam assistência técnica nas propriedades, colocados no frasco com formol e enviados para a Embrapa Pecuária Sul. Na impossibilidade de coleta pelo médico veterinário, poderá ser disponibilizada a seguinte alternativa: em datas agendadas, de preferência em conjunto com as coletas de ceratoconjuntivite, um veterinário colaborador do projeto poderá fazer a retirada das lesões nas propriedades. Os proprietários ficarão responsáveis pelo pagamento da taxa de retirada do tumor (valor acertado diretamente com o veterinário) e pela medicação a ser aplicada após a cirurgia.
- As amostras que chegarem à Embrapa Pecuária Sul serão encaminhadas, juntamente com o formulário de identificação do animal, para o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF para realização de análise histopatológica e confirmação de diagnóstico (Carcinoma de Células Escamosas Oculares).
- Serão enviados, juntamente com o pote para coleta de tecido, dois cartões de coleta de pelo (cauda do animal). Coletar pelo da cauda do animal com lesão (cartão 1). Utilizar o outro cartão (cartão 2) para colher o pelo da cauda de outro animal mantido nas mesmas condições de manejo, com idade semelhante e que não apresentou a lesão ocular (se possível, coletar o pelo de um animal com algum grau de parentesco com o bovino que apresentou o carcinoma ocular).
- No caso de touros reprodutores, serão enviados tubos para coleta de sangue com EDTA. A análise do DNA desses animais será mais detalhada, portanto será realizado o sequenciamento total do genoma desses bovinos.

Endereço para envio das biópsias e dos formulários:

A/C Alessandro P. Minho, BR 153, KM 633, Vila Industrial, Caixa Postal 242, CEP: 96401-970 Bagé / RS

Embrapa

Pecuária Sul

CGPE 12337