

Estudio clínico, histopatológico e inmunohistoquímico del carcinoma de células escamosas ocular bovino en el departamento de Nariño, Colombia

Clinical, histopathological and immunohistochemical study of bovine ocular squamous cell carcinoma in the Nariño department, Colombia

Dario Alejandro Cedeño Quevedo^{1,2}, Carlos Alfredo Calpa Oliva¹,
Nikole Lloyd Bravo¹, Dayana Rodríguez Hernández¹

RESUMEN

Se evaluaron los aspectos clínicos e histopatológicos, así como la expresión inmunohistoquímica del carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) en 24 vacas con neoplásicas oculares y periorbitales en el departamento de Nariño, Colombia. Las variables fueron raza, sexo, edad, ubicación y estadio del carcinoma. Se determinó la inmunexpresión de p53 y CK19. Se trabajó con 15 Holstein, 3 Normado, 3 Simhol, 2 criollas y una Montbéliarde, clasificadas según edad en <3 años (4%), 4-7 años (64%) y >8 años (32%). El carcinoma se desarrolló en la membrana nictitante (n=13), limbo esclerocorneal (7), párpado inferior (2), córnea (1) y en la conjuntiva (1). Diez vacas presentaron un área periorbital hipopigmentada. Se observó pequeñas placas de color gris blanquecino en el tercer párpado y córnea, nódulos irregulares y verrugas sésiles con forma de coliflor en la región limbocorneal y párpados. Microscópicamente los tumores bien diferenciados presentaron rompimiento de membrana basal, núcleos hiper cromáticos, mitosis atípicas y pleomorfismo nuclear. Se encontró células dispuestas en cordones con centros queratinizados en forma de perlas lamelares. El p53, en 18 casos presentó inmunexpresión débil, tanto en animales con pigmentación normal como con piel hipopigmentada. La reactividad del CK19 fue nula en todas las muestras. El estudio demostró que la valoración morfológica de las lesiones de carcinoma de células escamosas ocular mediante teñidas con H-E fue la mejor herramienta diagnóstica, aunque no fue posible clasificar el CCEO por estadios de acuerdo con el grado de diferenciación microscópica.

Palabras clave: bovinos, citoqueratinas, p53, CK19

¹ Grupo de Investigación Buiatría, Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Colombia

² E-mail: dcedeno@udenar.edu.co

Recibido: 3 de febrero de 2020

Aceptado para publicación: 28 de septiembre de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

ABSTRACT

The clinical and histopathological aspects as well as the immunohistochemical expression of ocular squamous cell carcinoma (CCEO) were evaluated in 24 cows with ocular and periorbital neoplasms in the department of Nariño, Colombia. The variables were breed, sex, age, location, and stage of the carcinoma. Immunoreexpression of p53 and CK19 was determined. There were 15 Holstein, 3 Normado, 3 Simhol, 2 Creole and one Montbéliarde cows and were classified according to age in <3 years (4%), 4-7 years (64%) and >8 years (32%). The carcinoma developed in the nictitating membrane (n=13), sclerocorneal limbus (7), lower eyelid (2), cornea (1) and in the conjunctiva (1). Ten cows presented a hypopigmented periorbital area. Small whitish gray plaques were observed on the third eyelid and cornea, irregular nodules, and cauliflower-shaped sessile warts in the limbus corneal region and eyelids. Microscopically, well-differentiated tumors showed rupture of the basal membrane, hyperchromatic nuclei, atypical mitosis, and nuclear pleomorphism. Cells arranged in cords with keratinized centers in the form of lamellar beads were found. P53, in 18 cases, showed weak immunoreexpression, both in animals with normal pigmentation and with hypopigmented skin. The reactivity of CK19 was null in all the samples. The study demonstrated that morphological evaluation of ocular squamous cell carcinoma lesions using H-E staining was the best diagnostic tool, although it was not possible to classify the CCEO by stage according to the degree of microscopic differentiation.

Key words: bovines, cytokeratins, p53, CK19

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas ocular (CCEO) bovino es la neoplasia más frecuente en ganado, siendo causa de descarte, pérdidas económicas e implicaciones en bienestar animal, ya que el auto traumatismo es efecto de incomodidad en respuesta al dolor (Carvalho *et al.*, 2012). Este tipo de carcinoma se presenta mayormente en bovinos *Bos taurus*, pues las razas cebuínas y criollas son más resistentes (Brogdon y McLaughlin, 1992). Es considerado un tumor maligno de los queratinocitos del estrato malpighiano de la epidermis y su desarrollo se asocia a la exposición prolongada a la luz ultravioleta, la pérdida de pelo en la zona y la piel hipopigmentada periorbital, debido a que la melanina es un factor fotoprotector en las superficies epidérmicas y mucosas (Ramos *et al.*, 2007).

Según Tsujita y Plummer (2010) el carcinoma se puede ubicar en las uniones lateral corneal esclerótica (66.7%) y medial (16.5%). Gharagozlou *et al.* (2007) menciona una mayor presentación en el ojo derecho (40%) que en el izquierdo (37.5%) y una ocurrencia en ambos ojos de 21.9%. El carcinoma de células escamosas de la conjuntiva varía en gravedad, desde la displasia leve hasta el carcinoma *in situ* y carcinoma invasivo. El tumor en todas las especies se desarrolla a través de una serie de etapas premalignas, placas epidérmicas y papilomas, para después desarrollarse durante meses o años a carcinoma *in situ* e invasivo (Tsujita y Plummer, 2010).

En general, los tumores pueden tener un aspecto papilar de tamaño variable, tomando forma de coliflor, de superficie ulcerada y sangran con facilidad. Inician con alteracio-

nes que son caracterizadas por tener eritema, edema, descamación y formación de costras y ulceración. A medida que invade la dermis, el sitio se torna firme y el área ulcerada más amplia y profunda (Fernandes, 2007). Microscópicamente, el carcinoma bien diferenciado presenta células dispuestas en cordones o espirales con centros queratinizados, muchos en forma de perlas lamelares, y/o dispuestos en puentes intercelular, pudiendo presentar queratinización individual. Los carcinomas diferenciados presentan varias células con queratinización individual y menos frecuencia de perlas y puentes intercelulares. En los indiferenciados es difícil reconocer las células tumorales como originadas de queratinocitos (Ramos *et al.*, 2008).

La radiación ultravioleta causa mutación en oncogenes y genes supresores de tumores, y se han detectado mutaciones específicas de p53 en carcinomas de células escamosas cutáneas inducidas por esta (Coulter *et al.*, 1995). Generalmente la mutación del gen p53 se acumula en el núcleo de células tumorales en cantidades detectables por inmunohistoquímica (Schliephake, 2003). Tiene un papel importante en el control del ciclo celular, actuando como factor de transcripción de la estabilidad genómica, de la diferenciación celular y de la apoptosis (Whyte *et al.*, 2002). La detección de esta proteína suele indicar la ineficacia de los mecanismos estabilizadores; es decir, hay una pérdida de la función proapoptótica, lo que da lugar a un crecimiento continuo tumoral (Werkmeister *et al.*, 2000). Este gen no se detecta en el estudio inmunohistoquímico de las células normales. Debido a sus patrones de distribución específicos, se les utiliza como marcadores de diferenciación en patología tumoral (Fornazari *et al.*, 2017).

La citoqueratina 19 (CK19) se expresa normalmente en epitelio escamoso estratificado. Se considera que es un marcador de premalignidad y susceptibilidad al cáncer

como el CCEO. Las citoqueratinas juegan un papel en la apoptosis (Zhong *et al.*, 2007). La utilidad clínica de las citoqueratinas como marcadores tumorales está bien establecida y reflejan actividad tumoral teniendo un valor predictivo de la enfermedad muy preciso (Malhotra *et al.*, 2016). La importancia de los estudios de inmunohistoquímica en el carcinoma de células escamosas radica en la necesidad de precisar el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Fletcher, 1986). Para obtener una mejor comprensión de la patología y del proceso de transformación neoplásica, se evaluó la expresión mediante el análisis inmunohistoquímico de p53 y CK19, y las características histopatológicas y clínicas del cáncer de células escamosas ocular en bovinos del departamento de Nariño, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Estudio

El estudio fue de tipo descriptivo, no probabilístico, realizado en 26 vacas con lesiones neoplásicas oculares y periorbitales. El estudio tuvo el aval del Comité Bioético (Código 1633, 2018) de la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño.

Localización

El estudio fue realizado en fincas de la región andina del departamento de Nariño, Colombia, especialmente en los municipios de Pasto, Pupiales, Ipiales, Guachucal y Tuquerres a una altura aproximada de 3000 msnm. La temperatura ambiental promedio es de 14 °C, humedad relativa de 82%, precipitación anual de 800 mm, brillo solar mínimo de 80 horas/mes y máximo de 107 horas/mes, un índice UV mínimo de 12.8 y máximo de 15.3.

Animales

Se trabajó con 26 bovinos hembra, de edades comprendidas entre 3 y 16 años, de raza Holstein (n=17), Normando (n=3), Holstein x Simmental (n=3), criolla (n=2), y Montbéliarde (n=1). Estos animales hacen parte de la casuística presentada entre septiembre de 2018 y mayo de 2019. A cada animal se le realizó el examen clínico y oftalmológico para determinar la distribución anatómica de la lesión ocular o periorbital. Se les clasificó por edad como jóvenes (menores de tres años), adultos (entre tres y siete años) y seniles (mayores de siete años).

Carcinoma

Se realizó una caracterización anatomopatológica de las lesiones cutáneas, basándose en la observación macroscópica de las características que presentaban las lesiones tumorales. El carcinoma fue clasificado en cuatro estadios y la distribución anatómica en ojo y región periorbital. De igual forma, dependiendo del caso clínico se realizaron cirugías para obtener la muestra para histopatología. Dependiendo del órgano o tejido involucrado, se realizó la exenteración del globo ocular y tejidos adyacentes, la resección de la membrana nictitante, la queratectomía superficial en el caso de las córneas o una blefaroplastia en el caso del párpado inferior.

Histología e Inmunohistoquímica

Los tejidos fueron depositados en frascos estériles con una proporción de 1/10 de formol al 10%. Las muestras se tabularon y se transportaron en una nevera al laboratorio de patología especializado de alta tecnología, Bio-Molecular Diagnostica, en la ciudad de Bogotá. Para histopatología, las muestras se tiñeron con la coloración de Hematoxilina - Eosina (H-E) y se estudió con 40x de magnificación. La tinción inmunohistoquímica se realizó utilizando el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa. Se utilizaron dos

anticuerpos policlonales comerciales dirigidos contra antígenos humanos (CK19 de Novocastra, Clon b170, 1 ml liofilizado NCL-CK19 FP y NCL-p53-CM1, de Novocastra, Newcastle, Reino Unido).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presenta la distribución de las lesiones según sexo, edad, raza y ubicación. De los 26 animales estudiados, 24 presentaron lesiones compatibles con carcinoma de células escamosas en el ojo y región periorbital, mientras uno en un caso se trató de papilomatosis y en otro de un absceso en la subconjuntiva, ambos con la lesión en el tercer párpado. Según raza, la más afectada fue la Holstein (15, 57.6%) y por edad, la mayor frecuencia fue en adultas (16, 64%, seguida de semiles (8, 32%) y jóvenes (1, 4%, lo que indica que el factor asociado a la frecuencia del CCEO fue en animales adultos.

Catorce vacas (56%) presentaron el carcinoma de células escamosas en la membrana nictitante, 7 (28%) en el limbo esclerocorneal, 2 (8%) en párpado, 1 (4%) en córnea y uno (4%) en conjuntiva (Figura 1). El porcentaje de animales con el área periorbital hipopigmentada fue de 40% (10 vacas). En cuanto a la distribución del carcinoma, 12 ocurrieron en el ojo izquierdo, 9 en el ojo derecho y 4 vacas tuvieron afectados ambos ojos.

Al examen clínico macroscópico se observaron lesiones en placa cutánea conjuntival de color blanco-grisáceo con superficie lisa (Figura 2a) en dos animales, hiperqueratosis de superficie rugosa disgregada (Figura 2b) en siete vacas, seis con carcinomas no invasivos con superficie granulomatosa o ulcerosa (Figura 2c) y nueve animales con carcinoma invasivo de aspecto de coliflor con grietas, necrosis, cubierto de sangre, moco, fibrina y/o pus, con base ancha que irrumpe en los tejidos adyacentes (Figura 2d) (Rosenberger, 1988).

Cuadro 1. Distribución de lesiones oculares o periorbitales en 26 bovinos en el departamento de Nariño, Colombia, según sexo, edad, raza y ubicación

Caso	Raza	Edad (años)	Piel (Pigmento)	Estadio clínico	Ubicación ¹	Ojo	Diagnóstico ²
1	Normando	6	Hipo ³	2	Cornea	Der.	CCE
2	Normando	4	Hipo	3	M. nictitante	Der.	CCE
3	Normando	6	Hipo	4	L. E.	Izq.	CCE
4	Holstein	9	Normal	4	L. E.	Izq.	CCE
5	Holstein	7	Normal	1	M. nictitante	Izq.	CCE
6	Holstein	3	Normal	3	M. nictitante	Der.	CCE
7	Holstein	8	Normal	-	M. nictitante	Izq.	AS
8	Holstein	6	Hipo	3	M. nictitante	Ambos	CCE
9	Holstein	5	Hipo	1	M. nictitante	Izq.	CCE
10	Holstein	7	Normal	2	M. nictitante	Der.	CCE
11	Holstein	7	Normal	2	M. nictitante	Izq.	CCE
12	Simhol	10	Hipo	4	L. E.	Der.	CCE
13	Simhol	7	Hipo	3	M. nictitante	Ambos	CCE
14	Simhol	6	Hipo	4	Párpado	Izq.	CCE
15	Holstein	6	Normal	2	M. nictitante	Izq.	CCE
16	Holstein	8	Normal	4	L. E.	Der.	CCE
17	Holstein	9	Normal	4	L. E.	Der.	CCE
18	Montbéliarde	16	Hipo	4	Párpado	Ambos	CCE
19	Criolla	8	Normal	3	M. nictitante	Izq.	CCE
20	Criolla	7	Normal	3	M. nictitante	Ambos	CCE
21	Holstein	8	Normal	4	M. nictitante	Der.	CCE
22	Holstein	6	Normal	2	M. nictitante	Izq.	CCE
23	Holstein	9	Hipo	2	Conjuntiva	Der.	CCE
24	Holstein	7	Normal	-	M. nictitante	Izq.	Papiloma
25	Holstein	7	Normal	2	L. E.	Izq.	CCE
26	Holstein	7	Normal	4	L. E.	Izq.	CCE

¹ M. nictitante: Membrana nictitante; L.E. Limbo esclerocorneal

² CCE: carcinoma de células escamosas; AS: absceso subconjuntival;

³ Hipo: Hipopigmentación

Pen la histopatología, las muestras coloreadas con H-E presentaron hallazgos microscópicos similares entre ellas, y que corresponden a un cáncer ocular de células escamosas. En el primer estadio (Figura 3a) se observaron núcleos grandes, ovoides, con uno o dos nucléolos en su interior; además de

un citoplasma abundante que varía de pálido a eosinofílico, con bordes bien definidos. Estas células intentan formar cordones. También se presenta edema intercelular. Para el segundo estadio (Figura 3b) el carcinoma se evidencia bien diferenciado con paraqueratosis, formando distintas «perlas» de



Figura 1. Distribución del carcinoma de células escamosas en el ojo y región periorbital en vacas de leche del departamento de Nariño, Colombia. (a) en córnea; (b) en limbo esclerocorneal y párpado superior; (c) en párpado inferior; (d) en membrana nictitante

queratinas, similar al estadio tres (Figura 3c), observándose además un acentuado infiltrado linfoplasmocitario intersticial. En el estadio cuatro (Figura 3d) las células tumorales poseen bordes distintos, con forma poligonal o fusiforme, de núcleos grandes, ovales, con cromatina finamente granular y con uno o dos nucléolos. El citoplasma es abundante, eosinofílico y homogéneo y se puede presenciar claramente la formación de perlas de queratina e infiltración linfoplasmocitaria.

En cuanto a los resultados de la inmunohistoquímica, 18 (75%) muestras presentaron una sobreexpresión débil, 4 sobreexpresión y en 2 no hubo reactividad. Para el primer estadio (Figura 4a), se encontró una marcación nuclear de p53 en cerca del 40% de células tumorales; similar al estadio dos (Figura 4b). En el estadio tres (Figura 4c) se observa la expresión nuclear de p53 en las

células tumorales y presencia de células inflamatorias que acompañan el tumor, quienes fueron negativas para este supresor tumoral. En el estadio cuatro (Figura 4d) se observa la inmunomarcación en el núcleo de la mayoría de células epiteliales malignas como también la presencia de nucléolo evidente en las células con expresión nuclear de la proteína.

No se evidenció reactividad al marcador CK19 (Figura 5) en las muestras realizadas independientemente del estadio clínico en el que se encontraba.

DISCUSIÓN

La mayor frecuencia de CCEO en vacas Holstein se debió probablemente a que es la raza lechera predominante en la región,



Figura 2. Lesiones clínicas encontradas en el carcinoma ocular de células escamosas en bovinos. (a) Estadio uno en membrana nictitante; (b) Estadio dos en conjuntiva y tercer párpado; (c) Estadio tres en limbo esclerocorneal; (d) Estadio cuatro en limbo esclerocorneal

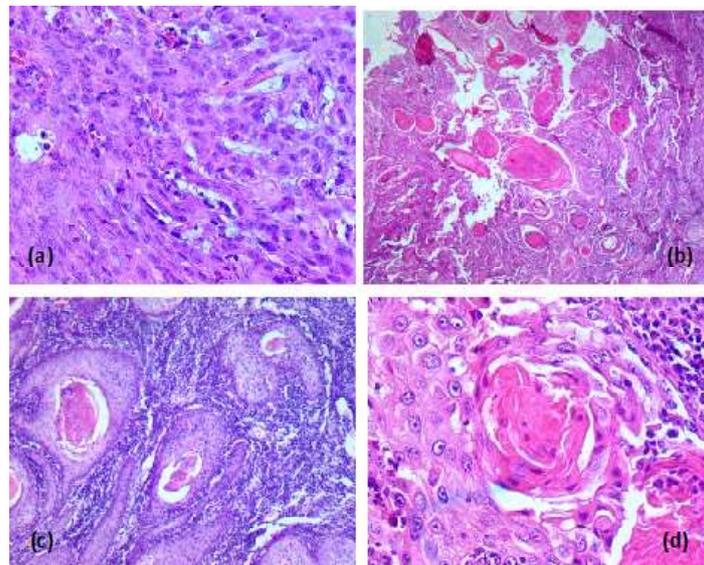


Figura 3. Hallazgos microscópicos del carcinoma de células escamosas ocular en bovinos. (a) Estadio uno; (b) Estadio dos; (c) Estadio tres; (d) Estadio cuatro (H-E, 40x)

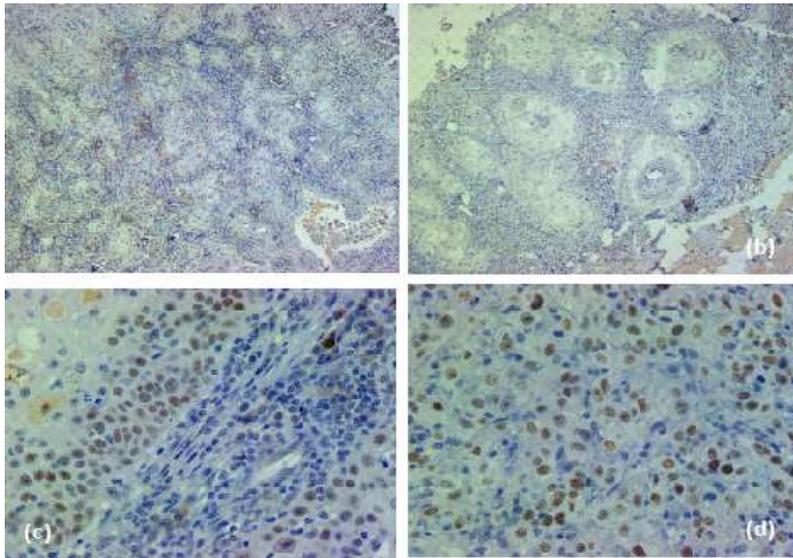


Figura 4. Hallazgos microscópicos de inmunohistoquímica con marcador p53 en el carcinoma ocular de células escamosas en bovinos. (a) Estadio uno; (b) Estadio dos; (c) Estadio tres; (d); Estadio cuatro (10x)

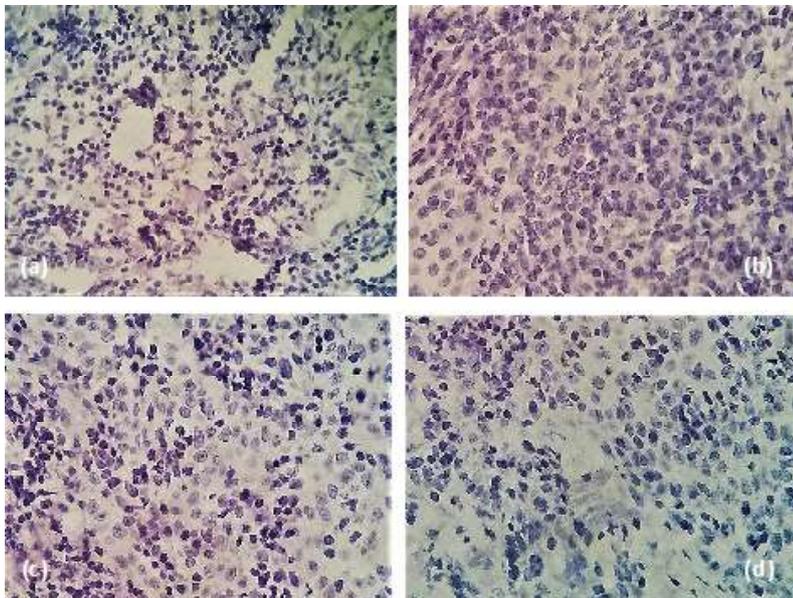


Figura 5. Hallazgos microscópicos de inmunohistoquímica con marcador CK19 en el carcinoma ocular de células escamosas en bovinos (40x). No se evidencia reactividad en ninguno de los estadios. (a) Estadio uno; (b) Estadio dos; (c) Estadio tres; (d) Estadio cuatro

además de presentar una piel hipopigmentada. Todos los casos en las vacas Montbéliarde, Simhol y Normando se presentaron en piel hipopigmentada en los ojos y tejidos periorbitales, lo cual facilita el desarrollo de carcinomas (Carvalho *et al.*, 2012). Las lesiones en dermis se han reportado especialmente en las uniones mucocutáneas y se evidencia en pacientes que carecen de pigmentación en la epidermis (Carvajal, 2012). Dadas las características fenotípicas de piel hipopigmentada del párpado y la zona esclerocorneal se describen razas con mayor predisposición a desarrollar este tipo de carcinomas, entre ellas, Hereford, Holstein, Simmental, Ayrshire y Charoláis (Carvalho *et al.*, 2012). Además, la presentación del CCEO se relaciona directamente a factores como altitud y latitud de la zona geográfica donde los animales son expuestos a intensa radiación solar durante largos periodos y si tienen o no piel pigmentada (Narayanan y Saladi, 2010).

El factor edad es un factor asociado al desarrollo del CCEO, a mayor edad hay mayor riesgo. La gran mayoría de los bovinos con carcinoma en este estudio fueron adultos y seniles, lo que coincide con el trabajo de Carvalho *et al.* (2012) en Brasil.

Los hallazgos del CCEO encontrados macroscópicamente fueron similares a las reportadas por Cardona *et al.* (2013). La presencia de «perlas» de queratinas y un acentuado infiltrado de linfoplasmocitario intersticial coincide con el estudio de Ramos *et al.* (2008). Por otra parte, Bhargava *et al.* (2010) no encontraron una relación clara entre el grado de la tumoración y la tasa de curación, el estadio de la enfermedad y la afectación metastásica.

Los animales estudiados se mantenían en una región de latitud baja y a una altitud por encima de los 2600 msnm, con exposición a rayos UV mínimo de 80 horas/mes y máximo de 107 horas/mes con un índice UV mínimo de 12.8 y máximo de 15.3. Por lo tanto, es concebible que las mutaciones inducidas por los rayos ultravioleta tuvieron cierta

influencia en la etiología de CCEO. Sin embargo, no fue el factor etiológico más importante ya que en la mayoría de los casos mostraron inmunexpresión débil de p53. El gen supresor p53 juega un papel significativo en la carcinogénesis de diversos tejidos, y su prevalencia en bovinos se ha relacionado directamente con la exposición a la radiación con rayos ultravioleta. La mutación de este gen que codifica para la proteína p53, está relacionada con los factores que intervienen en la génesis del tumor (Sánchez *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos difieren de lo observado en informes anteriores de CCEO que demostraron una fuerte inmunexpresión de p53 en un porcentaje mayor de casos en animales con piel hipopigmentada (Carvalho *et al.*, 2005). Por lo tanto, no se pudo establecer una asociación entre la inmunexpresión de p53 y la diferenciación de células cancerosas que corrobora los hallazgos de otros investigadores.

En la piel normal el CK19 se expresa de forma particularmente intensa en las células basales de la epidermis y en los anejos cutáneos. Resulta por tanto positiva en neoplasias epiteliales, tanto benignas como malignas, y negativa en todas las neoplasias mesenquimales y melanocíticas en humanos (Makin *et al.*, 1984). El CK19 se encuentra en la mayoría de las células escamosas carcinomas y tanto en lesiones primarias como metastásicas. La importancia de CK19 en el patrón de expresión en carcinomas escamosos es evidente; sin embargo, no está clara la no reactividad del CK19 en el CCEO bovino, lo cual merece más investigación.

CONCLUSIONES

- El estudio demostró que la valoración morfológica de las lesiones de carcinoma de células escamosas ocular con tinción H-E continúa siendo la mejor herramienta diagnóstica, aunque no es posible clasificar los estadios del carcinoma por su grado de diferenciación microscópica.

- El marcador p53 mostró una inmun-expresión débil, tanto en animales con pigmentación normal como piel hipopigmentada.
- La importancia de CK19 en el patrón de expresión en carcinomas escamosos es evidente; sin embargo, se requiere mayor investigación de la no reactividad en el carcinoma de células escamosas ocular bovino.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones, Posgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) de la Universidad de Nariño por apoyar económicamente al proyecto.

LITERATURA CITADA

1. **Bhargava A, Saigal S, Chalishazar M. 2010.** Histopathological grading systems in oral squamous cell carcinoma: a review. *J Int Oral Health* 2(4). [Internet]. Disponible en: <https://www.ispcd.org/userfiles/rishabh/jioh-02-04-001.pdf>
2. **Brogdon D, McLaughlin S. 1992.** Bovine ocular squamous cell carcinoma. *Agri Practice* 13: 8-11.
3. **Cardona J, Vargas M, Perdomo S. 2013.** Estudio clínico e histopatológico del carcinoma de células escamosas de bovinos en el departamento de Córdoba, Colombia. *Rev Fac Cs Vets UCV* 54: 68-77.
4. **Carvajal S. 2012.** Squamous cell carcinoma with lung metastasis in a Colombian native equine: a case report. *Rev Ces Med Vet Zootec* 7: 56-63.
5. **Carvalho F, Dantas A, Riet-Correa F, Miranda Neto E, Simões S, Azevedo S. 2012.** Fatores de risco associados à ocorrência de carcinoma de células escamosas em ruminantes e equinos no semiárido da Paraíba. *Pesqui Vet Brasil* 23: 881-886. doi: 10.1590/S0100-736X2012000900012
6. **Carvalho T, Vala H, Pinto C, Pinho M, Peleteiro MC. 2005.** Immunohistochemical studies of epithelial cell proliferation and p53 mutation in bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Pathol* 42: 66-73. doi: 10.1354/vp.42-1-66
7. **Coulter LK, Wolber R, Tron VA. 1995.** Site-specific comparison of p53 immunostaining in squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 26: 531-533. doi: 10.1016/0046-8177(95)90249-X
8. **Fernandes, G. 2007.** Neoplasias em ruminantes e eqüinos. En: Riet-Correa F, Schild A, Lemos R, Borges J (eds). *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 3° ed. Brasil. p 650-656.
9. **Fletcher CDM. 1986.** The use of immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours. *Histopathology* 10: 771-773. doi: 10.1111/j.1365-2559.1986.tb02533.x
10. **Fornazari GA, Matti Kiupel JK, Sledge D, De Barros IR, Montiani-Ferreira F. 2017.** Ocular squamous cell carcinoma in Holstein cows from the South of Brazil. *Vet World* 10: 1413-1420. doi: 10.14202/vetworld.2017.1413-1420
11. **Gharagozlou MJ, Hekmati P, Ashrafihelan J. 2007.** Clinical and histopathological study of ocular neoplasms in dairy cattle. *Vet Arhiv* 77: 409-426.
12. **Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF. 1984.** Monoclonal antibody to cyto-keratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol* 37: 975-983. doi: 10.1136/jcp.37.9.975
13. **Malhotra R, Urs AB, Chakravarti A, Kumar S, Gupta VK, Mahajan B. 2016.** Correlation of Cyfra 21-1 levels in saliva and serum with CK19 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 37: 9263-9271. doi: 10.1007/s13277-016-4809-4
14. **Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. 2010.** Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol* 49: 978-986. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04474.x

15. **Ramos A, Mollerke D, Elias F, Gevehr C. 2007.** Carcinoma de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos: estudo de 50 casos no sul do Rio Grande do Sul. *Braz J Vet Res Anim Sci* 44: 5-13.
16. **Ramos A, Souza A, Norte D, Ferreira J, Fernandes C. 2008.** Tumores em animais de produção: aspectos comparativos. *Ciênc Rural* 38: 148-154.
17. **Rosenberger G. 1988.** Enfermedades de los bovinos. Tomo II. Buenos Aires: Ed Hemisferio Sur. 608 p.
18. **Sánchez J, Gómez D, Galera H. 2003.** Valor pronóstico del parámetro inmunohistoquímico p53 en los estadios I y II del carcinoma epidermoide de lengua móvil. *Rev Esp Cirugía Oral Maxilofacial* 25: 280-287.
19. **Schliephake H. 2003.** Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer - a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 32: 233-245.
20. **Tsujita H, Plummer CE. 2010.** Bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Clin Food Anim* 26: 511-529.
21. **Werkmeister R, Brandt B, Joos V. 2000.** Clinical relevance of erbB-1 and -2 oncogenes in oral carcinomas. *Oral Oncol* 36: 100-105.
22. **Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. 2002.** The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53? *J Oral Pathol Med* 31: 25-33. doi: 10.1034/j.1600-0714.2002.310301.x
23. **Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. 2007.** Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med O* 104: 377-384. doi: 10.1016/j.tripleo.2006.07.019