

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

**ASPECTOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS E AVALIAÇÃO DA FRAÇÃO
DE CRESCIMENTO (KI-67) DAS NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS
DIAGNOSTICADAS EM CÃES NO SETOR DE ANATOMIA
PATOLÓGICA DA UFRRJ (1999-2020)**

Nathália da Silva Carvalho

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

**Aspectos anátomo-patológicos e avaliação da fração de crescimento (Ki-67)
das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia
Patológica da UFRRJ (1999-2020)**

NATHÁLIA DA SILVA CARVALHO

Sob orientação da professora
Vivian de Assunção Nogueira Carvalho

E co-orientação da Doutora
Mariana Bezerra Mascarenhas

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Julho de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C331a Carvalho , Nathália da Silva , 1995-
Aspectos anátomo-patológicos e avaliação da fração de crescimento (Ki-67) das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ (1999-2020) / Nathália da Silva Carvalho .
- Seropédica , 2021.
77 f.: il.

Orientadora: Vivian de Assunção Nogueira Carvalho.
Coorientadora: Mariana Bezerra Mascarenhas .
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2021.

1. Canino. 2. Oncologia . 3. Tumores melanocíticos . I. Carvalho, Vivian de Assunção Nogueira , 1980-, orient. II. Mascarenhas , Mariana Bezerra, 1980-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

NATHÁLIA DA SILVA CARVALHO

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Patologia**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologiae Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/07/2021.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

VIVIAN DE ASSUNÇÃO NOGUEIRA CARVALHO, MV, DR., UFRRJ
(Orientadora)

APARECIDA ALVES DO NASCIMENTO, BIOL, DR., UFRRJ

SAMAY ZILLMANN ROCHA COSTA, MV, DR., IFFAR

MARIANA CORREIA OLIVEIRA, MV, DR., UNESA



Emitido em 2021

TERMO Nº 963/2021 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 09/09/2021 07:59)

APARECIDA ALVES DO NASCIMENTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matrícula: 3377607

Assinado digitalmente em 08/09/2021 14:51)

VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 2606155

(Assinado digitalmente em 09/09/2021 20:51)

MARIANA CORREIA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 116.356.567-96

(Assinado digitalmente em 08/09/2021 14:54)

SAMAY ZILLMANN ROCHA COSTA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 117.009.617-48

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
963, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **08/09/2021** e o código de verificação: **13babe3344**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho e a minha família por sonhar junto comigo e me possibilitar a realização dos meus sonhos, sem eles nada seria possível.

Aos meus pais por não medirem esforços para que eu pudesse estudar e me capacitar naquilo que escolhi seguir, por sorrirem e chorarem ao meu lado, pelas conversas e incentivos diários e por serem eles os verdadeiros responsáveis por tudo que sou. À minha irmã por ser um exemplo de força pra mim e por ter me dado o maior presente da vida, meu sobrinho, que nos momentos mais difíceis, mesmo sem saber, me salvou. Às minhas avós pela criação e os ensinamentos que nenhum conhecimento técnico jamais poderia oferecer. Aos demais familiares, pela torcida. Muito obrigada a cada um de vocês!

À equipe do Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela companhia, auxílio, aprendizado, paciência e por todos os momentos que passamos juntos. Em especial ao Asheley Henrique e Fernanda de Freitas que mais do que colegas de laboratório, tornaram-se amigos que vou levar pra vida inteira. Amo vocês!

Aos amigos do mestrado com os quais tive o prazer de compartilhar essa fase, especialmente à Kelly Freitas, Clara Mendes, Vinícius Vasconcelos e Ananda Buzzetti por toda troca de conhecimento e por tornarem tudo mais fácil e divertido nesses dois anos. Desejo a todos muito sucesso!

Aos meus demais amigos da vida, que nesse momento se mantiveram ao meu lado e torcendo sempre por mim. Vocês são muitos, mas certamente cada um sabe a importância que tem na minha vida.

A todos os professores que participaram da minha formação técnico-científica e humana ao longo da vida, para que hoje eu pudesse buscar sonhos maiores, em especial aos grandes mestres que compartilharam seus conhecimentos comigo durante a graduação e o mestrado e à minha orientadora Vivian Nogueira que está comigo desde meados da graduação como orientadora de iniciação científica sempre me dando oportunidades na patologia animal, o meu sincero obrigada!

Por fim e não menos importante, a todos os animais que já estiveram comigo e aos que ainda estão, que são fonte de inspiração e motivação para que eu seja uma profissional melhor a cada dia. É tudo por vocês!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pelo apoio e concessão das bolsas durante todo o período de realização deste trabalho.

RESUMO

CARVALHO, Nathália da Silva. **Aspectos anátomo-patológicos e avaliação da fração de crescimento (Ki-67) das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ (1999-2020)**. p.77 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

As neoplasias melanocíticas originam-se da proliferação de melanoblastos e melanócitos e são nomeadas melanomas, quando malignas e melanocitomas, quando benignas. Os melanomas correspondem a 7% das neoplasias malignas em cães, o que torna essencial estudo acerca destes tumores. Uma vez que expressam comportamento agressivo e histologia variável, exames complementares são necessários para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico. A atividade mitótica pode ser um importante critério de valor prognóstico para os melanomas, pois estima a taxa de proliferação celular. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram realizar um estudo dos tumores melanocíticos diagnosticados em cães no Setor de Anatomia Patológica (SAP) entre janeiro de 1999 a agosto de 2020, avaliar a fração de crescimento dessas neoplasias determinado pelo Ki-67 (MIB-1) e correlacioná-lo com a localização e critérios histológicos associados à gravidade. Além disso, objetivou-se estabelecer um método de contagem único e amplo para todos os tipos da neoplasia e suas localizações mais comuns. Foram avaliados os históricos, laudos de necropsias e biópsias e reavaliadas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). Todos os dados, incluindo os epidemiológicos, foram compilados. Os melanomas amelanóticos foram submetidos ao exame imuno-histoquímico com anticorpo Melan-A. Em seguida, realizou-se imuno-histoquímica com Ki-67 e as lâminas foram contracoradas com Giemsa. Calculou-se a fração de crescimento do Ki-67 ao contar as células em 10 campos aleatórios de cada lâmina em objetivas de 40x. Do total de 78 casos de neoplasias melanocíticas do SAP, 32 localizavam-se em cavidade oral, 29 em pele, nove em leito ungueal e as demais em locais variados, totalizando 41 fêmeas e 37 machos. Os cães SRD (29) foram os mais acometidos. A idade foi informada em 70 fichas e variou de três a 19 anos. Em 48 casos foi possível analisar as características histopatológicas. Com relação ao aspecto morfológico, os tumores foram classificados em fusiforme (um caso), epitelíóide (11 casos) ou misto (35 casos). O pleomorfismo foi acentuado em 36,9% das neoplasias e a média das mitoses, de todos os campos, foi de 10,5. Em 36/78 casos (33 melanomas e três melanocitomas) foi realizada a técnica imuno-histoquímica para Ki-67. Destes, 12 apresentaram resultado positivo: três melanomas amelanóticos, oito melanomas melanóticos e um melanocitoma. Após análise estatística, verificou-se que o resultado corroborou com a literatura, visto que a variante maligna apresentou maior fração de crescimento celular, maior índice mitótico que a variante benigna, além das demais alterações histológicas observadas. Sabe-se que, quando o valor da fração de crescimento do tumor encontra-se $\geq 15\%$, indica prognóstico desfavorável e está relacionado com índice mitótico ≥ 3 em 10 campos na objetiva de 40x. Em quatro casos de melanomas, a fração de crescimento corresponderam a 15,28%, 15,87%, 19,13%, e 51,3% e os índices mitóticos resultaram 5, 30, 60 e 70. Conclui-se que neoplasias melanocíticas são distribuídas igualmente em ambos os gêneros, acometem predominantemente cães a partir de três anos de idade e o local mais frequente da lesão é a cavidade oral, seguido por pele e leito ungueal. No que diz respeito às neoplasias melanocíticas diagnosticadas nos últimos 22 anos no Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pôde-se observar que os aspectos epidemiológicos relacionados ao sexo, idade, raça e localização corroboram com aqueles descritos na literatura, assim como os sítios de metástase. O melanoma melanótico foi

observado com mais frequência, semelhante ao relatada na literatura mundial. A morfologia celular mais observada no presente estudo foi do tipo misto, diferentemente da maioria dos relatos, onde a mais frequente é a forma epitelióide. A fração de crescimento determinada pela contagem de mitoses e imunorreatividade ao Ki-67 variou significativamente entre tumores melanocíticos localizados na cavidade oral e pele. Na variante benigna, o índice proliferativo foi menor quando comparado com as neoplasias malignas e o método de contagem utilizado neste trabalho mostrou-se efetivo para todos os tipos de neoplasias melanocíticas estudadas independente da localização.

Palavras-chave: canino, oncologia, tumores melanocíticos.

ABSTRACT

CARVALHO, Nathália da Silva. **Anatomopathological aspects and evaluation of growth fraction (Ki-67) of melanocytic neoplasms diagnosed in dogs in the Pathological Anatomy Sector of UFRRJ (1999-2020)**. p.77 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Melanocytic neoplasms originate from the proliferation of melanoblasts and melanocytes and are named melanomas when malignant and melanocytomas when benign. Melanomas account for 7% of malignant neoplasms in dogs, which makes it essential to study these tumors. Since they express aggressive behavior and variable histology, complementary tests are necessary for the establishment of diagnosis and prognosis. Mitotic activity may be an important criterion of prognostic value for melanomas, since it estimates the cell proliferation rate. Thus, the objectives of this work were to perform a study of melanocytic tumors diagnosed in dogs in the Sector of Pathological Anatomy (SAP) between January 1999 and August 2020, evaluate the growth fraction of these neoplasms determined by Ki-67 (MIB-1) and correlate it with the location and histological criteria associated with severity. In addition, we aimed to establish a single, comprehensive counting method for all types of the neoplasm and its most common locations. Histories, necropsy and biopsy reports were evaluated, and slides stained with hematoxylin and eosin (HE) were reevaluated. All data, including epidemiological data, were compiled. Amelanotic melanomas were subjected to immunohistochemical examination with Melan-A antibody. Then immunohistochemistry with Ki-67 was performed and the slides were counterstained with Giemsa. The growth fraction Ki-67 was calculated by counting the cells in 10 random fields of each slide under 40x objectives. Of the total 78 cases of SAP melanocytic neoplasms, 32 were located in the oral cavity, 29 in the skin, nine in the nail bed, and the rest in varied sites, totaling 41 females and 37 males. SRD dogs (29) were the most affected. The age was reported in 70 files and ranged from three to 19 years. In 48 cases it was possible to analyze the histopathological characteristics. Regarding the morphological aspect, the tumors were classified as fusiform (one case), epithelioid (11 cases) or mixed (35 cases). Pleomorphism was marked in 36.9% of the neoplasms and the mean number of mitoses, of all fields, was 10.5. In 36/78 cases (33 melanomas and three melanocytomas) the immunohistochemical technique for Ki-67 was performed. Of these, 12 were positive: three amelanotic melanomas, eight melanotic melanomas and one melanocytoma. When considering the Ki-67 growth fraction obtained and correlating the mitoses with the histological diagnosis, the result corroborated the literature, since the malignant variant presented more pronounced parameters than the benign variant. It is known that when the cell growth fraction value is $\geq 15\%$, it indicates unfavorable prognosis and is related to mitotic index ≥ 3 in 10 fields at 40x objective. In four melanoma cases, the proliferation indices corresponded to 15.28%, 15.87%, 19.13%, and 51.3% and the mitotic indices resulted 5, 30, 60, and 70. We conclude that melanocytic neoplasms are equally distributed in both genders, predominantly affect dogs over three years of age, and the most frequent site of the lesion is the oral cavity, followed by the skin and the nail bed. Regarding melanocytic neoplasms diagnosed in the last 22 years in the Pathology Sector of the Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, it could be observed that the epidemiological aspects related to sex, age, breed and location corroborate those described in the literature, as well as the metastasis sites. Melanotic melanoma was observed more frequently, similar to that reported in the world literature. The cell morphology most commonly observed in the present study was the mixed type, unlike most reports, where the epithelioid form is most frequent. The growth fraction determined by mitosis count and Ki-67 immunoreactivity

varied significantly between melanocytic tumors located in the oral cavity and skin. In the benign variant, the proliferative index was lower when compared to malignant neoplasms and the counting method used in this study proved to be effective for all types of melanocytic neoplasms studied regardless of location.

Key-words: canine, oncology, melanocytic tumors.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Idade e sexo de cães com neoplasias melanocíticas diagnosticados no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, entre 1999 a 2020	Página 16
Gráfico 2	Porcentagem de machos e fêmeas com neoplasias melanocíticas diagnosticadas no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, entre 1999 a 2020	17
Gráfico 3	Box-plot da análise de variância (ANOVA) entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki67 e o diagnóstico clínico. Os pontos no gráfico indicam outliers. mel) Melanoma. ma) Melanoma Amelanótico. mpm) Melanoma parcialmente melanótico. mlctm) melanocitoma	41
Gráfico 4	Box-plot da análise de variância (ANOVA) entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki67 e o local de incidência do melanoma. Os pontos no gráfico indicam outliers. Cav. Oral) Cavidade oral; Lei. Ung) Leito ungueal	42
Gráfico 5	Abundâncias absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. A) Diagnóstico; B) Presença de pigmentos; C) Atipia nuclear e D) Morfologia do nucléolo	43
Gráfico 6	Abundâncias absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. A) Pleomorfismo; B) Morfologia; C) Atividade juncional e D) Ulceração	44
Gráfico 7	Abundâncias absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. A) Necrose; B) Hemorragia e C) Inflamação	45
Gráfico 8	Correlação de Pearson entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki67 e a quantidade de mitoses por 10 campos	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Dados epidemiológicos das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no SAP/UFRRJ, entre 1999 a 2020	Página 17
Quadro 2	Comparação entre a fração de crescimento e demais características histopatológicas em relação ao diagnóstico e localização das neoplasias	34
Quadro 3	Dados epidemiológicos, diagnóstico e contagem de células positivas para Ki-67 em neoplasias melanocíticas	35
Quadro 4	Características histopatológicas das neoplasias melanocíticas em que foram realizados exames imuno-histoquímicos com Ki-67	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Melanoma melanótico em cão diagnosticado no SAP/UFRRJ. A- Nódulo escuro, ulcerado em cavidade oral de cão, Poodle, diagnosticado com melanoma melanótico. B- Nódulo enegrecido medindo cerca de 5cm, retirado de leito ungueal de cão da raça Rottweiler, diagnosticado com melanoma melanótico. C- Metástase de melanoma melanótico em pulmão. Observam-se diversos nódulos enegrecidos distribuídos aleatoriamente nos lobos caudais. D- Metástase de melanoma melanótico. Nódulo enegrecido medindo cerca de 3 cm de diâmetro localizado no baço.	Página 22
Figura 2	A e B- Pele Melanoma amelanótico em dois cães HE, 10x. C e D – Imonorreatividade com Melan-A. Contra-coloração Hematoxilina, aumento de 40x.	23
Figura 3	A- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma parcialmente melanótico, aumento de 20x. B- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma parcialmente melanótico, aumento de 40x. C- Imunorreatividade (Ki-67) em melanocitoma, aumento de 40x. D- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma melanótico, aumento de 40x. Contra-coloração com Giemsa.	47

ABREVIACOES

ANOVA	Análise de Variância
Cav	Cavidade
DAB	Diaminobenzidina
DNA	cido desoxirribonucleico
FN	Field Number (número de campo)
HE	Hematoxilina e Eosina
HRP	Polímero de peroxidase de rabanete
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imuno-histoquímica
Log	Logartimo
MIB-1	Imunologia molecular Burslet 1
MPD	Membro pélvico direito
MPE	Membro pélvico esquerdo
MTD	Membro torácico direito
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NI	Não Informado
OMS	Organizao Mundial da Saúde
PCNA	Proliferao celular de antígenos nucleares
SAP	Setor de Anatomia Patológica
SNC	Sistema nervoso central
SRD	Sem raça definida
TMS	Tempo médio de sobrevivência
TNM	"tumor" "node" "metastasis"
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 MELANÓCITOS	2
2.1.2 Melanina	2
2.2 NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS	2
2.2.1 Etiologia	2
2.2.2 Terminologia	3
2.2.3 Variantes maligna e benigna	3
2.2.4 Aspectos clínicos e epidemiológicos	4
2.3 ASPECTOS MACROSCÓPICOS	5
2.4 DIAGNÓSTICO E DIAGNÓSTICOS DIFERENCIAIS	5
2.4.1 Histopatologia	6
2.4.2 Imuno-histoquímica	7
2.4.2.1 Anticorpo Ki-67	7
2.5 PROGNÓSTICO	8
2.6 ESTADIAMENTO	9
2.7 TRATAMENTO	10
CAPÍTULO I	11
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	13
RESULTADOS	14
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÕES	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	29
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (GERAIS)	57

1 INTRODUÇÃO

A oncologia é uma área de grande relevância na medicina veterinária, e estima-se que as neoplasias constituam importante causa de óbito em animais de companhia. Com o aumento da expectativa de vida, as doenças associadas ao envelhecimento, como as neoplásicas, tendem a ser mais comuns. A identificação precoce das neoplasias pelos proprietários e o encaminhamento para o diagnóstico adequado, contribuem para um tratamento precoce, mais eficiente, com consequente aumento da perspectiva de cura e/ou aumento da sobrevida com qualidade de vida.

A grande finalidade de estudar neoplasias nos animais é vislumbrar diagnósticos, prognósticos e tratamento, além dos resultados servirem como base para posteriores estudos em humanos.

Os tumores melanocíticos podem ser benignos ou malignos. O melanoma é uma neoplasia maligna frequente em cães, especialmente naqueles de pele pigmentada. Os locais de maior ocorrência são: boca, lábio, pele e leito ungueal. Os melanomas da cavidade oral e leito ungueal possuem comportamento extremamente agressivo e prognóstico de reservado a desfavorável. Dentre os mais diversos tipos de câncer da cavidade oral, o melanoma é a principal neoplasia desta região e o cão serve de modelo biológico natural para o estudo desta neoplasia no homem (SMITH et al., 2002).

A proteína Ki-67 foi originalmente definida com o protótipo monoclonal Ki67, reconhecido em 1983 como um antígeno nuclear associado com a fração de crescimento celular. O Ki-67 é um marcador da fração de crescimento celular usado para detectar a proteína Ki-67 em tecidos parafinados expresso nas fases G1, M, G2 e S do ciclo celular, mas ausente na fase G0 (BERGIN et al., 2011). Em estudos realizados em humanos, foram encontrados níveis elevados de Ki-67 correlacionados com significativo volume e ainda, aumento em nevos displásicos, melanomas primários e melanomas metastáticos em comparação a nevos benignos (FIGUEIREDO et al., 2003).

A natureza agressiva do melanoma em humanos e animais, com tempos de sobrevivência curtos e benefícios mínimos obtidos através do tratamento cirúrgico e terapias adjuvantes, reforça a importância da realização de novos estudos para obtenção de uma modalidade de tratamento eficaz, prevenção de metastização e definição de fatores de prognóstico fidedignos para esta neoplasia (NISHIYA et al., 2016).

Há poucos estudos na literatura nacional que avaliam se a fração de crescimento determinada pelo Ki-67 varia significativamente entre tumores melanocíticos localizados em diferentes regiões no cão (pele, cavidade oral, leito ungueal) e se nos melanocitomas a fração de crescimento é menor quando comparado com os melanomas. De acordo com Smedley et al., (2011) não há um método de contagem único e padronizado para todas as localizações da neoplasia.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram realizar um estudo dos tumores melanocíticos diagnosticados em cães no Setor de Anatomia Patológica (SAP) entre janeiro de 1999 a agosto de 2020, avaliar a fração de crescimento dessas neoplasias determinada pelo Ki-67 (MIB-1) e correlacioná-la com a localização e critérios histológicos associados à gravidade. Além disso, objetivou-se estabelecer um método de contagem único e amplo para todos os tipos da neoplasia e suas localizações mais comuns (pele, cavidade oral e leito ungueal).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Melanócitos

Os melanoblastos têm origem neuroectodérmica e, durante o desenvolvimento fetal, migram para a pele e os bulbos capilares. As células produtoras de pigmentos maduros são conhecidas como melanócitos. Essas células dendríticas são encontradas intercaladas entre os queratinócitos basais da epiderme e o bulbo capilar. Moléculas de E-caderina estão presentes na superfície celular de melanócitos e queratinócitos; essas moléculas são o mecanismo de adesão entre os dois tipos de células (MEUTEN, 2016).

2.1.2 Melanina

A melanina produzida pelos melanócitos é armazenada nos melanossomas, que são transferidos para os queratinócitos por um processo conhecido como citocrínia. Os melanossomas se acumulam no citoplasma dos queratinócitos, onde servem para proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta (MEUTEN, 2016).

2.2 Neoplasias melanocíticas em animais domésticos

2.2.1 Etiologia

Em medicina humana, as neoplasias melanocíticas foram identificadas na antiguidade e têm sido encontradas em indivíduos mumificados que viveram há cerca de 2000 anos. O primeiro relato desses tumores na medicina veterinária foi realizado por Bunker em 1882, em um cão (GARMA-AVIÑA et al., 1981).

Os tumores que cursaram com pigmento, na antiguidade, eram chamados por Celsius de “melas”, devido a sua coloração negra. Em 1806, a LAENNEC introduziu o termo "melanose" para a alteração cutânea pigmentar, também fazendo uma primeira classificação: melanose encapsulada, melanose infiltrativa e melanose difusa. Em 1837, Carswell sugeriu o termo melanoma para tumores pigmentares malignos e, em 1864, Virchow classificou os melanomas em três tipos, dependendo de sua estrutura macroscópica: melanoma simples, caracterizado por aglomerações de células tumorais no tecido conjuntivo; melanocarcinoma, caracterizado por proliferações alveolares ou em forma de cordão; melanosarcoma, caracterizado por uma estrutura de células fusocelulares. Virchow descreveu a estrutura de tumores mistos melânicos e amelanóticos (BABA; CATÔI, 2007).

Acredita-se, que da mesma forma que em outras neoplasias, a origem do melanoma possua causa multifatorial, as quais alterações epigenéticas, predisposição genética e ação de agentes ambientais são tidos como fatores de risco (MODIANO et al., 1999; GRANDI; RONDELLI, 2016). Mas ao contrário do que é sugerido por Grandi e Rondelli (2016), Bergman et al. (2003), acreditam que a fotoexposição é um fator menos provável de ser agente causador principal do melanoma nos pequenos animais, já que esses possuem, de forma geral, o pelo, que lhes garante proteção, além de que os tumores podem se desenvolver em áreas com pouca ação da luz solar. Outra possível causa discutida na literatura é a transformação de melanocitomas em melanomas, mas tem-se relatado um número muito pequeno de casos desse tipo em animais (SMITH et al., 2002).

Diversos agentes carcinogênicos são responsáveis por lesar o DNA. Na pele, são exemplos de agentes a radiação solar, raios-x, produtos químicos, lesões contínuas entre outros. Existe ainda outros agentes desencadeantes para aumento das mutações celulares e

consequentemente do número de casos (SMITH et al., 2002), como a consanguinidade, raça e trauma. O trauma contínuo vai estimular o reparo celular, possibilitando maior ocorrência de mutações e o desenvolvimento da neoplasia (HARGIS; GINN, 2013).

Em cães, algumas raças apresentam alto risco, sugerindo um histórico genético específico (SEGAOULA et al., 2018). Genes supressores de tumor que podem estar relacionados ao melanoma são da família dos inibidores das quinases dependentes de ciclina (CDKI), que incluem os protótipos Waf-1 e Ink-4a. São produtos de vários genes que são peças fundamentais nas vias normais de controle do ciclo celular, e quando ocorre perda de suas funções ou inibição, podem levar ao crescimento celular descontrolado (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999). Para que se estabeleça um melanoma, ocorre um processo em várias fases, que tem início em manchas na pele, passando por neoplasias intermediárias que apresentam proliferação celular e estruturas teciduais e celulares anormais, até que se formam tumores altamente invasivos e metastáticos (MANZAN et al., 2005).

2.2.2 Terminologia

A terminologia das neoplasias melanocíticas nos animais domésticos não é homogênea. Alguns autores usam o termo melanoma cutâneo para descrever o tumor que demonstra diferenciação melanocítica, com potencial metastático não conhecido ou comprovado (GOLDSCHMIDT, 1994). Porém, esses mesmos tumores têm sido chamados de melanocitomas por outros autores (SMITH et al., 2002).

Similarmente, autores usam o termo melanoma maligno para indicar o tumor que tem potencial metastático conhecido ou comprovado (GOLDSCHMIDT, 1994). Porém, o termo melanoma tem sido utilizado para esses tumores potencialmente malignos (SMITH, 2002).

2.2.3 Variantes Maligna e Benigna

Neoplasias melanocíticas são formadas a partir de melanoblastos e melanócitos (células dendríticas derivadas dos melanoblastos neuroectodérmicos que migraram para a epiderme, derme, membranas mucosas e coróide durante a embriogênese) (SMITH et al., 2002). As lesões melanocíticas se originam de melanócitos (células originalmente da crista neural) que estão localizados na camada basal da epiderme e ocorre em várias espécies animais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Geralmente, os melanócitos não formam conexão ou contato entre si, mas junções aderentes e regulatórias com cinco a oito queratinócitos vizinhos, por meio da molécula de adesão E-caderina (SMITH et al., 2002). Como os melanócitos migram para outras posições do corpo no início da vida embrionária, os dois tipos de tumores podem se originar em qualquer local, mesmo sendo mais comuns na pele (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

O melanoma é um tumor que surge dos melanócitos, células geradoras de melanina através do melanossoma, por uma série de glicoproteínas melanosomáticas (WITHROW et al., 2012). As neoplasias surgem quando os melanócitos se multiplicam de forma autônoma e fogem do controle dos queratinócitos, crescendo difusa e descontroladamente, se tornando tumores sólidos que podem apresentar caráter benigno ou maligno (MANZAN et al., 2005). Quando em caráter benigno recebe o nome de melanocitoma e, quando maligno, melanoma ou melanoma maligno (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017; JONES; HUNT; KING, 2000).

O melanocitoma é uma neoplasia benigna decorrente dos melanócitos da epiderme, derme ou anexos (principalmente da bainha radicular externa do folículo piloso) (MEUTEN, 2016).

O melanoma em cães é uma neoplasia com um comportamento biológico muito variável, existindo muitos estudos que definem marcadores de prognóstico para esta neoplasia, mas poucos são os que os avaliam. Além disso, não existe um critério universalmente aceito pela comunidade científica no que diz respeito aos critérios de prognóstico para estes tumores, complicando assim as conclusões que se poderiam tirar dos poucos estudos que existem (SMEDLEY et al., 2011).

Este tumor é uma neoplasia maligna que ocorre em diversas espécies animais, sendo o tumor oral mais frequentemente diagnosticado em cães (BERGMAN et al., 2012). É localmente agressivo e com grande potencial metastático. Fatores como o estadiamento e classificação histopatológica são de extrema importância como fatores de prognóstico, embora os tempos de sobrevivência inconsistentes se relacionem com a imprevisibilidade desta doença (OTTNOD et al., 2013).

2.2.4 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Associado a essa neoplasia observam-se sinais clínicos como apatia, anorexia, disfagia e emagrecimento. Quando o melanoma ocorre na cavidade oral, também podem ser observados, dentes frouxos ou deslocados, salivação, deformação facial e/ou secreções nasais; extração dentária recente pode preceder o crescimento rápido de massa no local de extração (NELSON; COUTO, 2001). A apreensão dos alimentos pode estar anormal, e resultar em ulcerações secundárias ao traumatismo, em pacientes com neoplasias mais volumosas (CARVALHO, 2005). O cansaço pode ser sinal de anemia ou de metástase pulmonar precoce nos casos de neoplasia oral pequena (PROULX et al., 2003).

Cães com menos de um ano de idade ocasionalmente desenvolvem melanocitomas, mas é difícil estabelecer se são lesões congênitas. O pico de incidência é entre 7 e 12 anos. Embora várias raças estejam em maior risco, as cinco principais raças são Vizsla, Schnauzer miniatura, Setter irlandês, Schnauzer padrão e Terrier australiano (MEUTEN, 2016). Os melanocitomas são comuns na região da cabeça, tronco, bolsa escrotal, axila, membros e dígitos (GARMA-AVIÑA et al., 1981; CAMARGO et al., 2008).

De todas as neoplasias caninas, 30 a 40% são neoplasias de pele e tecido subcutâneo e, destes, cerca de 20% a 40% são malignos (HAUCK, 2013). O melanoma é uma neoplasia comum nos cães, especialmente naqueles com a pele bastante pigmentada, representa 3% de todas as neoplasias e até 7% de todos os tumores malignos (SMITH et al., 2002; BERGMAN, 2007). O melanoma é o tumor oral canino mais comum (BROWN; BAKER; BARKER, 2007), ocorre principalmente em animais de meia idade, tendo pico entre 10 e 13 anos e não há predisposição por sexo (TEIXEIRA et al., 2010; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Curiosamente, os melanomas caninos estão fortemente associados à predisposição racial e a cães de pelagem preta (GILLARD et al., 2013).

Outras localizações incluem o olho e testículos (SMITH et al., 2002; BERGMAN, 2007). Melanoma retal em cães também foi relatado (CLARKE; RISSI, 2018). Conforme descrito anteriormente, a cavidade oral e junção mucocutânea dos lábios são os locais onde a maioria dos casos de melanoma ocorre em cães e somente cerca de 10% surgem da pele hirsuta e há predileção pela pele da cabeça e escroto (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). O melanoma surge com maior frequência na cavidade oral (56%), lábios (23%), pele (11%) e dígito (8%), e outras localizações, incluindo o globo ocular, correspondem apenas a 2% dos casos (SMITH et al., 2002).

Segundo Ramos-Vara et al. (2000), quando observado em cavidade oral, os cães são mais frequentemente acometidos na mucosa labial ou gengiva mandibular com 53% dos casos. Já um estudo realizado por Sabbatini et al. (2018) com 50 felinos, observou-se que

quarenta e três casos (86%; 27 cutâneos e 16 mucosos) foram diagnosticados como melanomas malignos e apenas 7 (14%; 6 cutâneos e 1 oral) como melanocitomas.

O melanoma ocorre com frequência nas raças Cocker Spaniel, Poodle Miniatura, Cão Pastor da Anatólia, Boxer, Gordon Setter, Chow Chow e Golden Retriever (RAMOS-VARA et al., 2000; SILVA, 2013), entretanto CAMARGO et al. (2008) relataram maior ocorrência desta neoplasia em animais sem raça definida.

A predisposição masculina foi relatada (CAMARGO et al., 2008), contudo outros trabalhos revelaram que não há predisposição sexual (RAMOS-VARA et al., 2000, SMITH et al., 2002).

2.3 Aspectos Macroscópicos

Macroscopicamente, os melanomas podem ser pretos, amarronzados, castanho ou avermelhado. A pigmentação não é patognomônica dos tumores melanocíticos, uma vez que outras lesões neoplásicas ou não neoplásicas podem apresentar fenótipo semelhante. Os melanomas amelanóticos não produzem ou há baixa síntese de melanina e deve ser diferenciado de outros tumores com aspecto similar (TEIXEIRA, 2011). A principal característica dessa neoplasia é a manifestação de nódulo pedunculado solitário e delimitado, pigmentado, com coloração que varia de marrom a preta ou sem pigmentação, com tamanho entre 0,5 a 10 cm de diâmetro (SOUZA et al., 2011).

O melanoma inicia como uma mácula preta e se transforma em uma massa firme de crescimento rápido. Pode ser em forma de cúpula ou apresentar superfície ulcerada e de sangramento fácil (CARLTON; MCGAVIN, 2013). As massas nodulares geralmente são solitárias e de crescimento rápido, e são comuns necrose e ulceração, assim como invasão óssea pelos tumores gengivais (JONES; HUNT; KING, 2000; BROWN; BAKER; BARKER, 2007). O tamanho e o grau de pigmentação não são indicadores confiáveis do potencial maligno dessas neoplasias melanocíticas (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017).

Os melanocitomas variam consideravelmente em sua aparência, o que pode estar relacionado ao período em que estão presentes. As lesões variam em tamanho, desde pequenas máculas pigmentadas até massas maiores que podem ter 5 cm ou mais de diâmetro. A cor da neoplasia depende da quantidade de melanina nas células e varia de preto a vários tons de marrom, cinza e vermelho. A maioria dos melanocitomas é simétrica, circunscrita, mas sem cápsula definida. Na seção de corte, a epiderme geralmente está intacta e geralmente ocorre queda de pelos (MEUTEN, 2016). Podem ter aspecto de manchas pequenas até nódulos de 5 cm de diâmetro, geralmente pigmentados, de coloração preta ou amarronzada (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016).

2.4 Diagnóstico e diagnósticos diferenciais

O diagnóstico do melanoma oral e de pele baseia-se principalmente no exame histológico e citopatológico (CARVALHO, 2005). Pode ser de difícil diagnóstico, principalmente nos casos em que há pouca pigmentação melânica, ou até mesmo total ausência de pigmento, como nos melanomas amelanóticos (RAMOS-VARA et al., 2000). Outros diagnósticos de melanoma incluem o uso de colorações especiais na histoquímica, como Fontana Masson que marca os grânulos de melanina de preto e imunohistoquímica usando marcadores como Melan-A que é uma linhagem específica de marcador de melanócito (RAMOS-VARA; MILLER, 2011).

O surgimento da imuno-histoquímica diagnóstica utilizando diferentes biomarcadores tem um grande impacto na oncologia e tem sido referido carinhosamente como revolução marrom e marcadores mágicos (CHANDRASHEKARAIHAH et al., 2011). Mukaratirwa et al.

(2005) sugeriram investigação imuno-histoquímica usando marcadores tumorais para estudar a natureza e o comportamento de tumores, como discriminar os tumores entre benigno e maligno, classificar os tumores de acordo com a agressividade e risco metastático, e prever o prognóstico, as taxas de sobrevivência livres de doenças e taxas globais de sobrevivência após excisão cirúrgica ou terapia do tumor.

Os melanomas amelanóticos podem mimetizar outras neoplasias, como carcinomas anaplásicos, tumores neuroendócrinos, sarcomas fusiformes principalmente fibrossarcoma, hemangiopericitoma e tumores da bainha do nervo periférico e tumores de células germinativas (SMITH et al., 2002, MEUTEN, 2017). Quando em cavidade oral, também são diagnósticos diferenciais o fibrossarcoma, o condrossarcoma, o carcinoma de células escamosas e o osteossarcoma. No entanto, as neoplasias do epitélio odontogênico e do ligamento periodontal também devem ser incluídas na lista de diagnósticos diferenciais (PIPPI; GOMES, 2016).

2.4.1 Histopatologia

Microscopicamente, há uma grande variação quanto aos subtipos celulares, sendo classificadas também por seu comportamento biológico, localização e presença de pigmentação (BERGMAN, 2007; PRZEŹDZIECKI et al., 2015). O melanoma pode apresentar um quadro histopatológico dificultoso se o tumor ou a secção de biópsia não contém melanina, e os melanomas amelanóticos representam um terço de todos os casos (ROLIM et al., 2012; PRZEŹDZIECKI et al., 2015).

O melanoma tem como características um citoplasma pálido e abundante, com quantidades variáveis de pigmento, núcleos grandes pleomórficos e nucléolos proeminentes sendo a sua principal função a síntese de melanina, pigmento que confere cor aos pelos, pele e cabelos e protege a pele contra os raios solares (TEIXEIRA, 2011). Colorações especiais por histoquímica e imunohistoquímica podem ser úteis para diagnosticar estas variantes agranulares (VAIL; WITHROW, 2007).

Nos melanomas, as células neoplásicas na epiderme geralmente têm núcleos maiores e nucléolos mais conspícuos do que os encontrados nos melanocitomas, e as mitoses são mais frequentemente observadas. Os ninhos das células intraepidérmicas, quando presentes, são uma característica muito útil para confirmar o diagnóstico de melanoma, principalmente quando a melanina não pode ser demonstrada no componente dérmico. O componente dérmico geralmente consiste em melanócitos mais anaplásicos e pleomórficos que podem ser em forma epitelioides/poligonais ou fusiformes ou, em alguns casos, uma combinação dos dois tipos de células. As células contêm uma quantidade variável de melanina intracitoplasmática (MEUTEN, 2017).

A maioria dos melanocitomas é fácil de diagnosticar devido à presença de pigmento de melanina, que, se abundante, é visível de forma grosseira, em muitos casos com baixa ampliação. Na experiência do autor, em cães, as neoplasias melanocíticas cutâneas menores tendem a ter um componente epidérmico e intradérmico (composto), enquanto as neoplasias maiores geralmente não possuem componente epidérmico e são massas intradérmicas/subcutâneas (MEUTEN, 2017).

A maioria dos melanocitomas dérmicos pode ter uma morfologia redonda, epitelióide ou poligonal ou fusocelular, e casos raros podem ter morfologia de células dendríticas ou de balão. Os melanócitos são células neuroectodérmicas e, portanto, nos melanocitomas dérmicos, os melanócitos neoplásicos podem demonstrar diferenciação neuroidal à medida que amadurecem em direção à base da neoplasia, com perda de pigmento e formação de pequenos fascículos de células fusiformes envolvidas por um fino estroma fibrovascular (MEUTEN, 2017).

Um diagnóstico histopatológico de sarcoma indiferenciado ou anaplásico ou até mesmo câncer epitelial deve ser visto com suspeita de possível reclassificação como melanoma (TUOHY et al., 2009).

2.4.2 Imuno-Histoquímica

Imuno-histoquímica (IHC) é a detecção de antígenos em secções teciduais por meio de anticorpos específicos. A vantagem da técnica em relação a outros métodos de detecção de proteínas é a capacidade de correlacionar a presença de um antígeno com sua localização em um tecido ou célula (RAMOS-VARA, 2017).

Isso é muito importante para o estudo da função celular em tecidos normais e patológicos. Desde sua introdução, há seis décadas, a IHC tem sido aplicada extensivamente em múltiplas áreas da biologia, incluindo função celular e caracterização de lesões (RAMOS-VARA, et al., 2008).

Além da avaliação histológica tradicional, a imuno-histoquímica pode ser uma ferramenta prognóstica útil, semiquantitativa e objetiva. A imuno-histoquímica é cada vez mais usada, além da descrição histológica na oncologia humana por seu valor prognóstico (IDIKIO, 2009).

Entre os marcadores imuno-histoquímicos para melanoma, destacam-se a proteína S100, uma proteína ácida de ligação de cálcio que foi descoberta em células da glia, é expressa em vários tecidos e ajuda a regular inúmeros processos celulares, como contração, motilidade, diferenciação celular, entre outros (OHSIE, et al., 2008). Existem dois tipos de anticorpos que reagem com essa proteína permitindo sua visualização, policlonal e monoclonal, ambos marcam lesões melanocíticas com um padrão de coloração forte e difusa que pode tingir tanto o citoplasma como núcleo (COLMENARES-ROLDAN; VELÁSQUEZ; VARGAS, 2008).

Outro marcador é Melan-A, também conhecido como MART-1, um antígeno associado com o melanoma, que é reconhecido por linfócitos T citotóxicos expressos pela maioria das lesões melanocíticas benignas e malignas, este é muito útil para detectar diferenciação melanócito com coloração citoplasmática (COLMENARES-ROLDAN; VELÁSQUEZ; VARGAS, 2008, ORDONEZ, 2014).

2.4.2.1 Anticorpo Ki-67

A caracterização da proteína Ki-67 foi realizada pela primeira vez por Gerdes et al. (1983). Posteriormente, em 1996, foi caracterizado o gene precursor desta proteína, com 30000 pares de bases, situado no braço longo do cromossoma 10.

A pKi-67 pode apresentar-se sob duas isoformas, uma de 395kDa e outra de 345kDa resultantes de splicing alternativo do mRNA. A pKi-67 é codificada pelo éxon 13, contendo os epítomos reconhecidos pelo anticorpo anti-Ki-67 e o anticorpo-MIB-1 (KUBBUTAT et al., 1994; DUCHROW et al., 1996).

A atividade do anticorpo monoclonal Ki-67, em identificar células em proliferação, correlaciona-se bem com uma baixa taxa de sobrevivência, tal como a presença de crescimento invasivo e da classificação com base em critérios citológicos (SMITH et al., 2002).

O valor preditivo do índice de Ki-67 para um período de dois anos de sobrevivência é de 97%, que é levemente superior ao valor preditivo associado à avaliação histológica de 91% (SMITH et al., 2002). A expressão proteica é regulada através de proteossomas, sendo a sua duração de semivida entre 60 a 90 minutos. A fração de crescimento Ki-67 é especialmente

útil para os casos com parâmetros histológicos conflitantes, e é um teste altamente objetivo que tem valor preditivo superior à de critérios histológicos (SMEDLEY et al., 2011).

A pKi-67 é encontrada em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0, sendo a característica que lhe permite ser usada como marcador da proliferação celular. Durante as fases do ciclo celular G1, S e G2, a pKi-67 está dentro do nucléolo e associada ao componente fibrilar denso, que consiste em uma das três regiões nucleares identificadas por microscopia eletrônica. Durante a mitose, ela desloca-se para a camada pericromossomal (BROWN; GATTER, 2002). Um índice mitótico inferior a 3 por cada 10 campos de ampliação é fortemente sugestivo de benignidade (VAIL; WITHROW, 2007).

Os melanomas altamente proliferativos, estudados através de análise imunohistoquímica por Ki-67 ou PCNA, têm sido associados com evolução maligna, mas estes procedimentos mais avançados são apenas ligeiramente mais preditivos que o índice mitótico (VAIL; WITHROW, 2007).

Apesar de ser reconhecido que pKi-67 tem um papel extremamente importante na fração de crescimento do tumor, não estão exatamente esclarecidas as suas funções. Antes, para identificação desta proteína, era usado o anticorpo anti-Ki-67, onde a desvantagem era a sua utilização só ser possível em tecido fresco ou congelado. Posteriormente, e até hoje, o anticorpo mais usado é o MIB-1 (molecular immunology Burstel-1), sendo este anticorpo utilizado em tecidos conservados em formol e incluídos em parafina, permitindo a realização de estudos retrospectivos com base em arquivos histológicos (BROWN; GATTER, 2002). Em medicina humana, estudos realizados por Brown e Gatter (2002) comprovaram que o Ki-67 constitui um marcador bom para o crescimento do tumor, através da sua marcação nuclear das células que se encontram em replicação, em neoplasias.

Uma análise de imagem computadorizada semelhante de um grupo misto de melanomas orais, leito ungueal e cutâneo demonstrou que uma maior marcação de Ki-67 se correlacionou com a diminuição do tempo de sobrevida em um acompanhamento de 6 meses (ROELS, 1999).

Não existe uma relação evidente entre as características histológicas, incluindo o índice mitótico e a intensidade de pigmentação, e a taxa de sobrevivência (SMITH et al., 2002).

2.5 Prognóstico

Diversos fatores estão implicados na determinação do prognóstico dos melanomas malignos, como: localização, características histológicas, raça e taxa de proliferação tumoral (VAIL; WITHROW, 2007).

O diagnóstico de melanoma cutâneo acarreta normalmente um prognóstico ruim, uma vez que é detectado em um estágio em que a ressecção cirúrgica dificilmente é curativa e em que existem metástases detectáveis nos linfonodos regionais (SMITH et al., 2002).

A localização é um importante indicador de prognóstico, pois os melanomas que surgem na cavidade oral, na região subungueal e nas junções mucocutâneas são normalmente considerados malignos, independentemente das suas características. Entretanto, ainda não foi possível estabelecer relação precisa entre as características histológicas, incluindo o índice mitótico e a intensidade de pigmentação, com a taxa de sobrevivência (SMITH et al., 2002).

Em relação à localização, é possível afirmar que os tumores que surgem a partir de zonas de pele com pelo são mais frequentemente benignos, assim como as lesões orais, são normalmente malignas (VAIL; WITHROW, 2007).

Em relação à predisposição racial, os melanomas têm maior probabilidade de serem benignos no Doberman e no Schnauzer miniatura (há uma probabilidade superior a 75% de as neoplasias em ambas as raças serem benignas), enquanto o Caniche miniatura é uma das raças

com maior predisposição para apresentar melanomas malignos (cerca de 85% dos melanomas diagnosticados nesta raça são malignos) (VAIL; WITHROW, 2007).

A mensuração da atividade mitótica pode ser um importante critério de valor prognóstico para os melanomas, pois fornece uma estimativa da taxa de proliferação celular (LAPRIE et al., 2001; SMEDLEY et al., 2011).

A principal característica histológica preditiva do prognóstico é o índice de mitose; no entanto, a invasão de vasos linfáticos é também um fator que deve ser considerado (SMITH et al., 2002). O comportamento agressivo desta neoplasia com infiltração local e metastização precoce, leva a um tempo médio de sobrevivência de apenas 1 ano (THEON et al., 1997; MURPHY et al., 2005). Um índice mitótico inferior a três figuras de mitose por cada 10 campos de ampliação é fortemente sugestivo de benignidade (HAUCK, 2013).

A excisão local agressiva é o tratamento primário em casos de melanoma, no entanto, devido ao seu potencial altamente metastático, a terapia sistêmica deve também ser considerada (LIPTAK; WITHROW, 2012; MCENTEE, 2012). Os melanomas mais agressivos apresentam prognóstico reservado, a recorrência após cirurgia é muito frequente (SCOTT et al., 2001).

A resposta ao tratamento cirúrgico varia de ruim a bom, com taxas de recidiva local de 0 a 59% dos pacientes e tempo de sobrevida em média (TMS) de 150 a 510 dias, com 21 a 35% dos pacientes vivos após 1 ano da terapia (LIPTAK; WITHROW, 2012). Já segundo Hauck (2013) as taxas de metastização variam de 30 a 75%.

Ao associar a quimioterapia à cirurgia, os estudos não conseguiram evidenciar melhora significativa no TMS para o controle do melanoma (BROCKLEY et al., 2013; BOSTON et al., 2014). Boston et al. (2014) observaram um TMS de 352 dias para pacientes que receberam terapia adjuvante, contra 335 dias do grupo tratado apenas com cirurgia, e Brockley et al. (2013) evidenciaram um TMS de 389 dias para cães com melanoma oral que receberam quimioterapia adjuvante à intervenção cirúrgica.

O melanoma oral apresenta boa resposta à radioterapia, com resposta variando de 83% a 94% e recorrência local de 11 a 27% (LIPTAK; WITHROW, 2012).

As metástases são frequentes (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2002). Independentemente da sua localização, os melanomas podem metastizar por via linfática ou sanguínea, sendo que os linfonodos regionais são normalmente os primeiros a serem afetados (SMITH et al., 2002).

Qualquer um dos órgãos viscerais pode ser potencialmente infiltrado, porém os pulmões são os órgãos mais frequentemente atingidos (SMITH et al., 2002). Mais raramente, a metastização atinge serosas, como o pericárdio, a pleura e o peritônio; as efusões associadas ao envolvimento destas serosas podem ser de coloração negra (SMITH et al., 2002).

Os melanomas também têm o potencial de invadir o tecido ósseo e causar a lise em áreas como o dígito, a mandíbula, a maxila, as vértebras e as costelas (SMITH et al., 2002). Não é incomum a dispersão dos melanomas a outras localizações, como o cérebro, coração e baço (SMITH et al., 2002).

Por último, a taxa de crescimento tumoral fornecida por técnicas laboratoriais como a histoquímica e imuno-histoquímica (ex. MIB-1/Ki-67, PCNA) são igualmente de valor prognóstico; deve-se ter em conta que são apenas pouco mais preditivos que a análise histológica e que o índice mitótico (VAIL; WITHROW, 2007).

2.6 Estadiamento Clínico

É baseado na observação da invasão local, regional e à distância de uma neoplasia. É imprescindível para a seleção do protocolo terapêutico mais adequado, o estabelecimento do prognóstico, a avaliação da resposta terapêutica, e para facilitar a troca de informação entre

técnicos e especialistas (VERSTRAETE, 2005; DE AGUIAR et al., 2007; DERVISIS, 2008; COYLE; GARRET, 2009).

É estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o Homem e espécies animais, um sistema anatômico com critérios de estadiamento, designado por sistema “TNM” (“Tumor”, “Node”, “Metastasis”). Onde, T de tumor inclui a dimensão, o grau de invasão e a ulceração da neoplasia, o N de linfonodo regional considera a invasão, o número e o tamanho dos linfonodos envolvidos, e o M de metástases caracteriza a sua presença ou ausência à distância (OWEN, 1980).

O sistema de estadiamento clínico da Organização Mundial de Saúde (OMS) para os tumores orais em cães pode ter um significado prognóstico em cães com melanoma oral (OWEN, 1980; HAHN, et al., 1994; RAMOS-VARA et al., 2000; PROULX, et al., 2003).

2.7 Tratamento

O tratamento recomendado é a excisão cirúrgica, radioterapia ou quimioterapia, mas a eficiência destes tratamentos é pequena e o prognóstico de sobrevivência por mais de um ano é de 10% (BENITES; MELVILLE, 2003). O tratamento ideal para melanoma maligno envolve uma combinação de controle local que pode ser alcançada através de excisão cirúrgica e/ou radioterapia (LAVER et al., 2018) e controle de tumores sistêmicos via quimioterapia ou imunoterapia para retardar a metástase (HENRY; HIGGINBOTHAM, 2010).

A radioterapia tem sido utilizada com sucesso no controle principalmente do melanoma oral e é provável que apresente benefícios para o tratamento do melanoma cutâneo, quando a cirurgia não é viável, podendo ser útil no controle dos melanomas cutâneos incompletamente excisados e dos linfonodos regionais eventualmente envolvidos (VAIL; WITHROW, 2007). Contudo, a maior parte dos cães com melanoma acaba por vir a óbito devido à dispersão sistêmica do processo neoplásico (VAIL; WITHROW, 2007).

A resposta terapêutica ao tratamento local com administração intralesional de cisplatina/carboplastina, hipertermia e terapia fotodinâmica parece ser de curta duração (VAIL; WITHROW, 2007).

Assim como a utilização de quimioterapia sistêmica no tratamento do melanoma parece pouco promissora (VAIL; WITHROW, 2007). Existem diversos agentes de quimioterapia utilizados, sobretudo no melanoma oral, nomeadamente, a mitoxantrona, doxorubicina, dacarbazina e carboplatina. De forma geral, a resposta tem sido fraca e de curta duração (VAIL; WITHROW, 2007). Porém, quimioterapia com carboplatina parece ser útil impedindo a progressão local e metastização, com uma resposta satisfatória em 28% dos casos (NORTHRUP; GIEGER, 2010).

Visto isso, recentemente, tem-se tentado utilizar a imunoterapia como medida terapêutica no melanoma canino. A imunoterapia é utilizada para restaurar o controle do ciclo celular e promover a morte de células tumorais através de células imunitárias efetoras (MODIANO et al., 1999). Este tipo de terapia permite alterar geneticamente as células do melanoma, tentando restabelecer o controle genético da divisão celular e evitar a sua capacidade de eludir a apoptose (MODIANO et al., 1999).

CAPÍTULO I

Aspectos anátomo-patológicos das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ (1999-2020)

Nathália da Silva Carvalho^{1*}, Fernanda de Freitas Alves Vieira¹, Asheley Henrique Pereira¹, Samay Zillmann Rocha Costa², Mariana Bezerra Mascarenhas³ e Vivian de Assunção Nogueira Carvalho¹

¹Setor de Anatomia Patológica (SAP), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Brasil. ²Instituto Federal Farroupilha, Campus Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Médica Veterinária Autônoma

Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 07, s/n - Zona Rural, Seropédica - RJ, 23890-000, Brazil. E-mail: nathysc@hotmail.com

RESUMO: Melanomas e melanocitomas são neoplasias formadas a partir de mutações em melanócitos e melanoblastos. Os melanomas têm grande importância na oncologia veterinária por serem agressivos, invasivos e altamente metastáticos. O objetivo desse trabalho foi realizar um estudo das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) de 1999 a 2020 e descrever os aspectos epidemiológicos e anátomo-patológicos. Todos os dados foram obtidos dos livros de registro e das fichas de necropsias e biópsias do SAP. Foram identificados 78 cães com neoplasias melanocíticas, com predomínio de fêmeas (n=41) e média de idade de 10 anos, com variação de 3-19 anos. Em relação à raça, 29 cães eram sem raça definida e os outros 48 eram de raças puras diversas. Esses dados corroboram com a literatura, uma vez que melanomas acometem principalmente cães de meia idade, sem predileção por sexo. Foram identificados 78 tumores localizados em diferentes regiões: 29 na pele/tecido subcutâneo, 32 na cavidade oral e nove no leito ungueal. Outras localizações incluíam: prepúcio, bolsa escrotal, córnea e orelha. Em cinco animais havia histórico de metástase em linfonodos regionais e, em outros quatro, havia metástase em linfonodos regionais e diversos órgãos (principalmente pulmão). Pacientes com lesões metastáticas regionais ou distantes totalizaram nove casos e demonstraram alto potencial de malignidade. Destes, um foi diagnosticado como melanoma amelanótico. Dos tumores avaliados, 82,05% (64/78) correspondiam a melanomas melanóticos, 7,69% (6/78) melanocitomas, e 10,25% (8/78) melanomas amelanóticos. Cães geriátricos apresentaram, em sua maioria, melanomas melanóticos. Com relação à morfologia celular segundo classificação da OMS (1998), a maior parte dos melanomas era misto (76,08%).

TERMOS DE INDEXAÇÃO: canino, melanoma, neoplasia, patologia

ABSTRACT: Melanomas and melanocytomas are neoplasms formed from mutations in melanocytes and melanoblasts. Melanomas have great importance in veterinary oncology because they are aggressive, invasive and highly metastatic. The aim of this work was to perform a study of melanocytic neoplasms diagnosed in dogs at the Sector of Pathological Anatomy (SAP) of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ) from 1999 to 2020 and describe the epidemiological and anatomopathological aspects. All data were

obtained from the registry books and the necropsy and biopsy forms of the SAP. We identified 78 dogs with melanocytic neoplasms, with a predominance of females (n=41) and a mean age of 10 years, with a range of 3-19 years. Regarding breed, 29 dogs were of undefined breed and the other 48 were mixed breeds. These data corroborate the literature, since melanomas affect mostly middle-aged dogs, without predilection for sex. We identified 78 tumors located in different regions: 29 in the skin/subcutaneous tissue, 32 in the oral cavity and nine in the nail bed. Other locations included foreskin, scrotum, cornea, and ear. In five animals there was a history of metastasis to regional lymph nodes, and in another four there was metastasis to regional lymph nodes and several organs (mainly lung). Patients with regional or distant metastatic lesions totaled nine cases and showed high potential for malignancy. Of these, one was diagnosed as amelanotic melanoma. Of the tumors evaluated, 82.05% (64/78) corresponded to melanotic melanomas, 7.69% (6/78) melanocytomas, and 10.25% (8/78) amelanotic melanomas. Geriatric dogs showed mostly melanotic melanomas. Regarding cell morphology according to WHO classification (1998), most melanomas were mixed

INDEX TERMS: canine, melanoma, neoplasm, pathology

INTRODUÇÃO

As neoplasias melanocíticas são derivadas de melanoblastos e melanócitos (células dendríticas provenientes dos melanoblastos neuroectodérmicos da epiderme, derme, membranas mucosas e coróide durante a embriogênese) (SMITH et al., 2002). Existem controvérsias na literatura, porém na medicina veterinária a forma benigna dos tumores melanocíticos é, geralmente, denominada melanocitoma e a maligna de melanoma (CAMARGO et al., 2008). Ambas as formas são consideradas frequentes, porém o melanoma é responsável por cerca de 7% das neoplasias malignas que acometem a espécie canina (SMITH et al., 2002; SMEDLEY et al., 2011).

O melanoma é uma neoplasia comum nos cães, representa 3% de todas as neoplasias (SMITH et al., 2002; BERGMAN, 2007) e não há predisposição por sexo (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2017). A neoplasia ocorre principalmente em animais de meia idade e há uma maior prevalência em raças pequenas e de pelagem mais escura e/ou membranas mucosas pigmentadas (GINN; MANSELL; RAKICH, 2007).

Os locais mais frequentemente acometidos são a cavidade oral, lábio, pele e leito ungueal. Outras localizações incluem o olho e testículos (SMITH et al., 2002; BERGMAN, 2007). Melanoma retal em cães também foi descrito (CLARKE; RISSI, 2018).

O diagnóstico do melanoma baseia-se principalmente nos exames histológico e citopatológico (CARVALHO, 2005). Além da avaliação histológica tradicional, a imunohistoquímica pode ser uma ferramenta prognóstica útil, semiquantitativa e objetiva (IDIKIO, 2009).

Nos melanocitomas, as lesões variam em tamanho, desde pequenas máculas pigmentadas até massas maiores que podem ter 5 cm ou mais de diâmetro. A cor depende da quantidade de melanina nas células e varia de preto a vários tons de marrom, cinza e vermelho. A maioria dos melanocitomas é simétrico, circunscrito, mas sem cápsula definida. Na seção de corte, a epiderme geralmente está intacta e ocorre queda de pelos (MEUTEN, 2016).

Uma vez que não há descrição atual e completa sobre os aspectos anátomo-patológicos das neoplasias melanocíticas em cães, inclusive na região metropolitana do Rio de Janeiro, objetiva-se neste trabalho analisar e discutir os dados epidemiológicos e anátomo-patológicos observados nas neoplasias diagnosticadas em cães no Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no período compreendido entre 1999 e 2020.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O trabalho foi realizado no Laboratório de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica (SAP) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Coleta de Amostras

Foram analisados e revisados todos os protocolos de necropsias e biopsias de neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no SAP no período compreendido entre 1999 a 2020. Posteriormente, foi realizada a leitura das lâminas e os dados detalhados sobre

histórico, anamnese, raça, sexo, idade, localização da lesão, natureza da neoplasia, aspectos clínicos e achados anátomo-patológicos foram compilados.

Crítérios de Inclusão

Foram incluídas todas as neoplasias diagnosticadas no exame de rotina como melanocíticas (melanocitomas e melanomas) e confirmadas no exame imuno-histoquímico.

Histopatologia

As neoplasias foram classificadas de acordo com o boletim Médico Veterinário da OMS (1998) em: melanocitomas, melanomas epitelióides, melanomas fusiformes e melanomas mistos. Uma segunda classificação baseada no fenótipo dividiu as neoplasias em melanoma melanótico, melanoma amelanótico, melanoma parcialmente melanótico. Adicionalmente foram avaliadas as áreas de necrose e úlceras, a atipia celular, ou seja, o tamanho e a forma da célula, do núcleo e nucléolo, presença de mitose, fosse ela atípica ou não. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 Field Number 20.

Imuno-histoquímica

Realizou-se exame imuno-histoquímico com anticorpo Melan-A (Dako-Clone A103) para as neoplasias diagnosticadas como melanoma amelanótico. As secções histológicas foram desparafinadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3%, para bloqueio das peroxidases endógenas. Após a lavagem, as lâminas ficaram submersas em tampão Citrato em pH 6.0 por 20 min em banho-maria a 96°C para recuperação antigênica. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5% (Molico® - Indústria Brasileira) por 30 min. Os cortes foram incubados em estufa a 37 graus Celsius com o anticorpo Melan-A (Dako-Clone A103) pelo período de duas horas. O sistema de detecção utilizado foi o EnVision Flex/HRP - Dako e como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB). Todas as secções foram contra coradas por Hematoxilina e avaliadas em microscópio óptico, Nikon Eclipse E200. Para controle positivo, utilizou-se um caso de melanoma parcialmente melanótico com pouca pigmentação e, como controle negativo, o mesmo caso foi utilizado, porém incubado com PBS (tampão fosfato-salino).

RESULTADOS

De 1999 a 2020, foram realizados no SAP 4.634 exames de necropsias e biópsias de cães e, destes, 2.118 (45,7%) eram neoplasias.

Neste mesmo período foram diagnosticados 78 casos de neoplasias melanocíticas em cães, destes (12/78 [15,38%]) eram provenientes de necropsias e (66/78 [84,62%]) de biópsias encaminhadas ao SAP. Das necropsias, apenas (1/12 [8,33%]) era melanocitoma, (11/12 [91,67%]) eram melanomas melanóticos e, em três casos houve metástases em pulmão, rim, sistema nervoso central e músculo esquelético. O pulmão foi o órgão mais acometido nos três casos.

Dos 78 cães, 41 (52,56%) correspondiam a fêmeas e 37 (47,44%) a machos (Gráfico 1 e 2). Em relação à raça, apenas um protocolo não informava esse dado (1/78 [1,28%]). Dos 77 casos em que a raça constava, as mais prevalentes foram Poodle e Rottweiler, ambas com oito casos cada (8/77 [10,38%]). Outras raças incluíam Dachshund (5/77 [6,49%]), Cocker Spaniel

(4/77 [5,19%]), Chow Chow (3), Doberman (3) e Pinscher (3) (3/77 [3,9%]), Pastor Alemão (2), Boxer (2), Weimaraner (2), Yorkshire (2) e Beagle (2) (2/77 [2,6%]), Pitbull (1), Labrador (1), Golden Retriever (1) e Shar-pei (1) (1/77 [1,3%]). Cães sem raça definida (SRD) totalizaram 29 (37,66%). A idade estava informada em (70/78 [89,74%]) protocolos, e variou de 3 a 19 anos (Gráfico 1). Todos os cães eram adultos (com três ou mais anos de idade) e notou-se uma nítida concentração dos casos em cães com cerca de 10 anos (11/70 [15,71%]). Os aspectos epidemiológicos das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no SAP/UFRRJ estão descritas em Quadro 1.

Dos 78 registros, 68 protocolos informaram aspectos macroscópicos (87,18%). Em 54 protocolos havia informação sobre a coloração (79,41%) e a enegrecida foi a mais prevalente (29/54-53,70%), seguida da esbranquiçada (11/54-20,37%), áreas esbranquiçadas por vezes enegrecidas (8/54-14,81%) e outras colorações totalizaram seis casos (6/54-11,11%). O tamanho estava presente em 20 de 68 protocolos (29,41%), e variou entre 0,2 a 10 cm de diâmetro. Desses 68, foram evidenciadas lesões ulceradas (16/68 [23,53%]), superfície irregular (13/68 [19,11%]), áreas multilobulada (6/68 [8,82%]) (Figura 1), hemorragia e consistência firme (5/68 [7,35%]), aderência e infiltração (4/68 [5,88%]), aspecto friável, presença de exsudato e consistência macia (3/68 [4,41%]), áreas císticas, alopecias e circunscritas (2/68 [2,94%]), osteólise, miíase e atrofia nasal em um caso cada, correspondendo a 1,47%. Importante ressaltar que o número de aspectos macroscópicos é superior ao número de casos, uma vez que cada lesão pode apresentar mais de um achado concomitante. Apenas nove protocolos informavam os sinais clínicos (9/78), incluindo anorexia (2/9) dispneia, prostração, halitose, odor fétido, dificuldade de mastigação, prurido e sinais neurológicos.

As manifestações clínicas relacionadas à cavidade oral foram principalmente, dificuldade de mastigação e apreensão dos alimentos, o que ocasionava anorexia, além de desnutrição, halitose, deslocamento de dentes e osteólise. Na pele, observaram-se alopecia, prurido, exsudatos e nódulos com presença de miíase. Quando em leito ungueal, os nódulos cursaram com dificuldade de locomoção (Figura 1, B).

Todos os 78 casos de neoplasias melanocíticas incluídas neste estudo tinham descrições referentes à localização. Desses, (32/78 [41,03%]) apresentavam-se em cavidade oral, (29/78 [37,18%]), na pele e (9/78 [11,54%]) no leito ungueal/membro e os demais em localizações diversas: prepúcio, bolsa escrotal, córnea e orelha.

Em (6/78 [7,7%]) casos foram informadas metástases em linfonodos regionais e em outros (4/78 [5,13%]) casos foram descritos metástases para pulmão (Figura 1, C), e em dois destes, havia metástase também para outros órgãos, como tireoide, adrenal, músculo esquelético, sistema nervoso central e rim.

A avaliação criteriosa das características histopatológicas foi realizada em 48/78 [61,54%] casos, devido à disponibilidade ou a conservação das lâminas e/ou blocos. Além disso, a análise de alguns parâmetros microscópicos foi prejudicada, pois o grau de pigmentação dificultava a análise das características nucleares e a técnica de clarificação danificou os cortes onde foi realizada.

Os aspectos histológico e morfológico da neoplasia foram classificados de acordo as regras da OMS (1998) e subdivididos em: melanomas epitelioides, compostos por células arredondadas que se localizam nas camadas da epiderme, com bordas discretas e arredondadas, citoplasma abundante e vítreo, núcleo largo e nucléolo proeminente; melanomas fusiformes, em que verificou-se proliferação de células alongadas, que formavam ondas e feixes na região mesenquimal, com estroma escasso e algumas vezes em forma de ninho e melanomas mistos, em que observavam-se ambos tipos celulares proliferados. Das 47 neoplasias avaliadas, foram observadas 1 com característica fusiforme (1/47 [2,13%]), 11 epitelioides (11/47 [23,40%]) e 35 mistos (35/47 [74,47%]). O pleomorfismo foi acentuado

em 36,95% (17/46) e a atipia nuclear esteve presente em 37 casos (77,08%) dos casos, porém foi acentuada em 10 casos (27,02%). Em 41,66% (20/48) dos tumores, havia grande quantidade de melanina. Os nucléolos mostraram-se múltiplos em 37,77% (17/45) e evidente em 55,55% (25/45) das neoplasias. Para contagem da mitose foi realizada a média de todos os casos, totalizando 10,5 mitoses em 10 campos com aumento de 40x.

Nos tumores diagnosticados na retina (coloração HE) como melanomas amelanóticos, foi realizada e imuno-histoquímica com anticorpo Melan-A (Dako Clone A103) e observou-se imunorreatividade em oito casos (10,25%) (Figura 2).

Gráfico 1: Idade e sexo de cães com neoplasias melanocíticas diagnosticados no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, entre 1999 a 2020

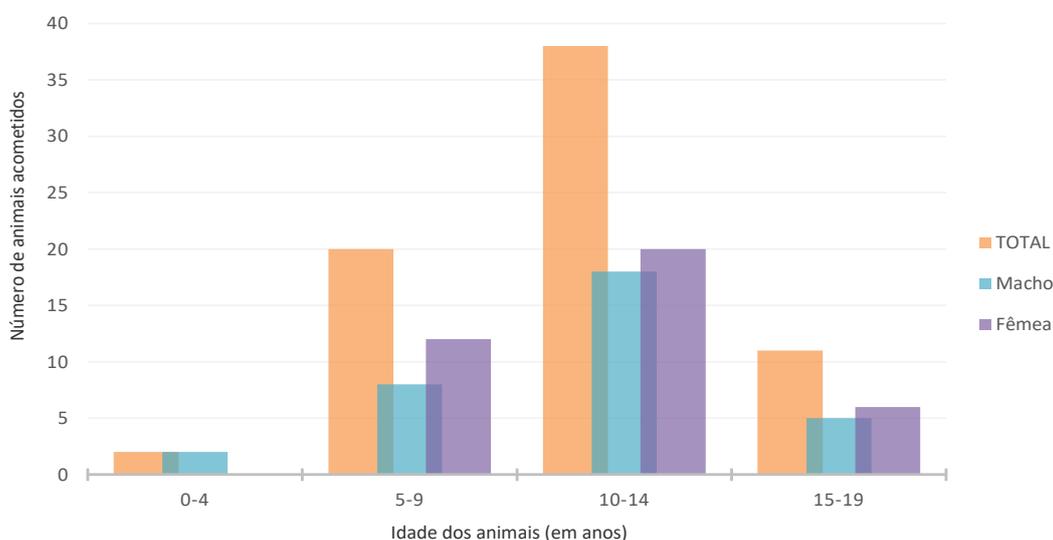
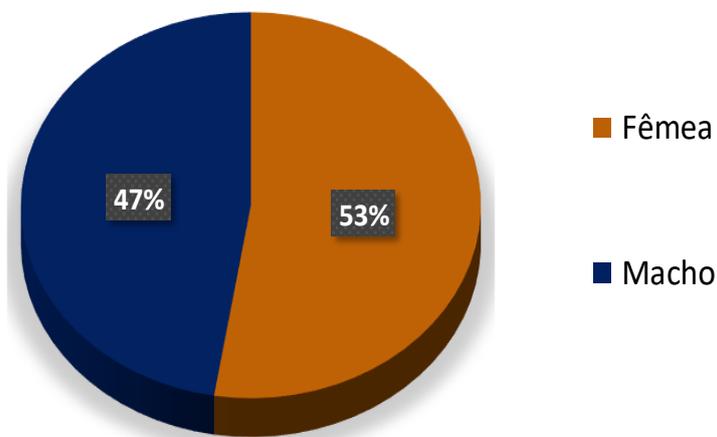


Gráfico 2: Porcentagem de machos e fêmeas com neoplasias melanocíticas diagnosticadas no Setor de Anatomia Patológica (SAP) da UFRRJ, entre 1999 a 2020



Quadro 1: Dados epidemiológicos das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no SAP/UFRRJ, entre 1999 a 2020

SAP	Raça	Sexo	Idade	Pelagem	Localização	Diagnóstico
36660	SRD	macho	11 anos	marrom	pele	Melanocitoma
36649	Beagle	macho	14 anos	típica	pele	Melanoma melanótico
36571	Poodle	macho	8 anos	champanhe	pele	Melanoma Amelanótico
36446	SRD	fêmea	NI	preta	pele	Melanoma Melanótico
36204	Labrador	fêmea	9 anos	NI	orelha	Melanoma parcialmente melanótico
36147	SRD	fêmea	9 anos	amarela	pele	Melanocitoma
36034	Dachshund	fêmea	9 anos	marrom	Cavidade oral	Melanocitoma
36022	SRD	fêmea	13 anos	marrom	plano nasal	Melanocitoma
35966	Chow Chow	fêmea	11 anos	NI	cavidade oral/lábio	Melanoma Amelanótico
35884	Cocker Spaniel	fêmea	15 anos	preta	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
35584	SRD	macho	15 anos	amarela	pele	Melanoma parcialmente melanótico

35257	Pastor Alemão	macho	11 anos	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
35164	SRD	fêmea	15 anos	amarela	pele	Melanoma parcialmente melanótico
35030	Yorkshire	macho	10 anos	típica	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
34983	SRD	fêmea	8 anos	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
34936	Chow Chow	macho	13 anos	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
34919	Pinscher	macho	7 anos	NI	pele	Melanocitoma
34916	Dachshund	macho	10 anos	NI	prepúcio	Melanoma Amelanótico
34838	SRD	fêmea	7 anos	NI	mpe	Melanoma Melanótico
34768	Weimaraner	fêmea	10 anos	NI	pele	Melanoma Melanótico
34685	Boxer	fêmea	12 anos	NI	pele	Melanoma parcialmente melanótico
34672	Dachshund	macho	15 anos	NI	Pele/região escapular direita	Melanoma parcialmente melanótico
34635	Yorkshire	fêmea	11 anos	típica	cavidade oral	Melanoma Melanótico
34591	Dachshund	macho	7 anos	NI	mandíbula esquerda/linfonodo	Melanoma parcialmente melanótico
34562	Rottweiler	fêmea	8 anos	típica	leito ungueal	Melanoma Amelanótico
34506	Rottweiler	macho	10 anos	típica	mandíbula direita	Melanoma parcialmente melanótico
34473	SRD	fêmea	10 anos	NI	comissura labial direita	Melanoma Melanótico
34341	Pitbull	macho	11 anos	NI	bolsa escrotal	Melanoma Melanótico
34323	Boxer	fêmea	9 anos	NI	pálpebra	Melanoma parcialmente melanótico
34314	SRD	macho	12 anos	NI	masseter	Melanoma parcialmente

						melanótico
34304	Chow Chow	macho	3 anos	NI	palato	Melanoma parcialmente melanótico
34268	Rottweiler	fêmea	5 anos	típica	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
34255	Poodle	macho	12 anos	preto	palato duro	Melanoma parcialmente melanótico
34245	Shar Pei	fêmea	7 anos	NI	cavidade oral	Melanoma
34199	Poodle	macho	12 anos	marrom	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
34146	Poodle	fêmea	13 anos	NI	pele	Melanoma Amelanótico
33995	Pinscher	fêmea	10 anos	típica	pele	Melanoma Melanótico
33904	SRD	fêmea	11 anos	marrom	cavidade oral	Melanoma Amelanótico
33759	Beagle	macho	8 anos	típica	pele	Melanoma Melanótico
33490	SRD	fêmea	15 anos	dourada	pele de mama	Melanoma Melanótico
33172	NI	macho	17 anos	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
H273/15	Golden Retriever	macho	adulto	marrom	pulmão, rim, músculo esquelético, SNC, adrenal	Melanoma Melanótico
H150/15	SRD	fêmea	10 anos	não informado	leito ungueal	Melanoma Melanótico
H44/15	SRD	macho	9 anos	NI	lábio	Melanoma Amelanótico
H381/14	SRD	fêmea	18 anos	NI	pele da mama	Melanoma Melanótico
H376/14	SRD	macho	10 anos	NI	pálpebra inferior direita	Melanocitoma com área de leve atipia
H360/14	SRD	macho	15 anos	NI	cavidade oral	Melanoma melanótico
H308/14	Cocker Spaniel	fêmea	9 anos	NI	mandíbula	Melanoma parcialmente melanótico

H218/14	Rottweiler	fêmea	14 anos	típica	palato mole	Melanoma parcialmente melanótico
H210/14	Cocker Spaniel	macho	12 anos	NI	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H208/14	Cocker Spaniel	fêmea	NI	NI	leito ungueal mpd	Melanoma Melanótico
H164/14	Poodle	fêmea	7 anos	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
H194/13	SRD	fêmea	10 anos	NI	pele/mama	Melanoma Melanótico
H14/12	Poodle	fêmea	12 anos	NI	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H299/11	SRD	fêmea	8 anos	NI	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H151/11	SRD	macho	12 anos	NI	pele	Melanoma Melanótico
H27/11	SRD	fêmea	11 anos	NI	olho/córnea	Melanoma parcialmente melanótico
H204/10	SRD	fêmea	NI	NI	cavidade oral	Melanoma parcialmente melanótico
H182/10	SRD	macho	13 anos	NI	pele	Melanoma parcialmente melanótico
H109/10	Dachshund	fêmea	14 anos	NI	pele	Melanoma melanótico
H105/10	SRD	fêmea	11 anos	NI	pele	Melanoma melanótico
H367/09	SRD	macho	8 anos	branca e preta	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H312/09	SRD	fêmea	10 anos	caramelo e branca	pele	Melanoma parcialmente melanótico
H121/09	Pinscher	fêmea	12 anos	NI	pele próximo a mama direita	Melanoma Melanótico
H17/09	Rottweiler	macho	8 anos	NI	pele	Melanoma parcialmente melanótico
H103/08	Dobermann	macho	15 anos	NI	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H130/06	Dobermann	macho	10 anos	NI	pele	Melanoma Melanótico

H128/06	Poodle	fêmea	17 anos	acinzentada	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H197/05	SRD	fêmea	19 anos	branca e caramelo	pálpebra superior esquerda	Melanoma Melanótico
H101/05	Rottweiler	macho	11 anos	típica	cavidade oral	Melanoma
H86/05	Weimaraner	fêmea	12 anos	marrom	pele	Melanoma Melanótico
H194/03	SRD	macho	12 anos	NI	cavidade oral	Melanoma Amelanótico
H144/03	Dobermann	fêmea	NI	marrom e caramelo	cavidade oral	Melanoma Melanótico
H72/03	Rottweiler	macho	adulto	típica	dígito mtd	Melanoma Melanótico
H04/02	SRD	macho	adulto	NI	mpe	Melanoma parcialmente melanótico
H104/00	Rottweiler	macho	4 anos	típica	dígito	Melanoma Melanótico
H155/99	Poodle	macho	8 anos	NI	boca	Melanoma Melanótico
H49/99	Pastor Alemão	macho	NI	NI	cavidade oral	Melanoma Amelanótico

NI: Não informado; snc: Sistema nervoso central; mpd: Membro pélvico direito; mtd: Membro torácico direito; mpe: Membro pélvico esquerdo; SRD: Sem raça definida.

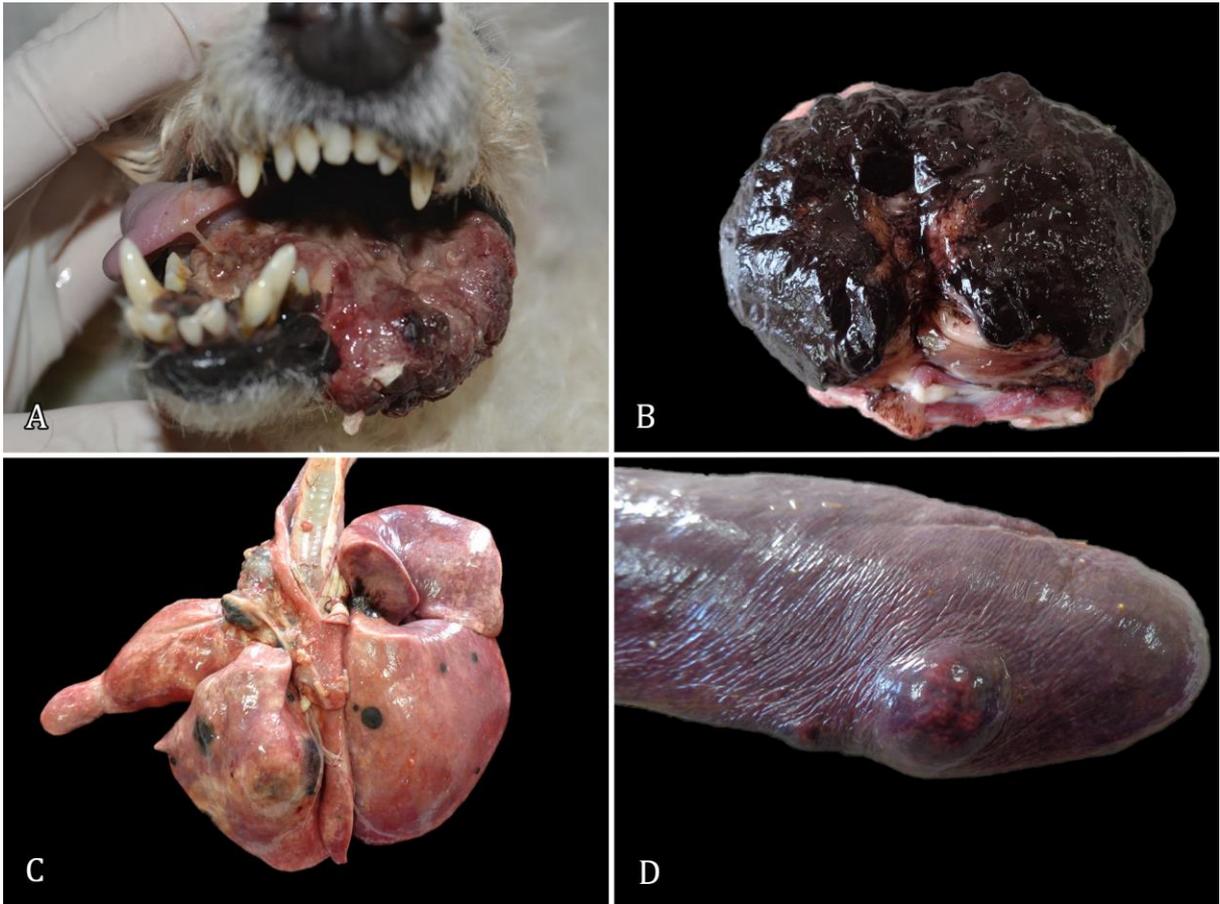
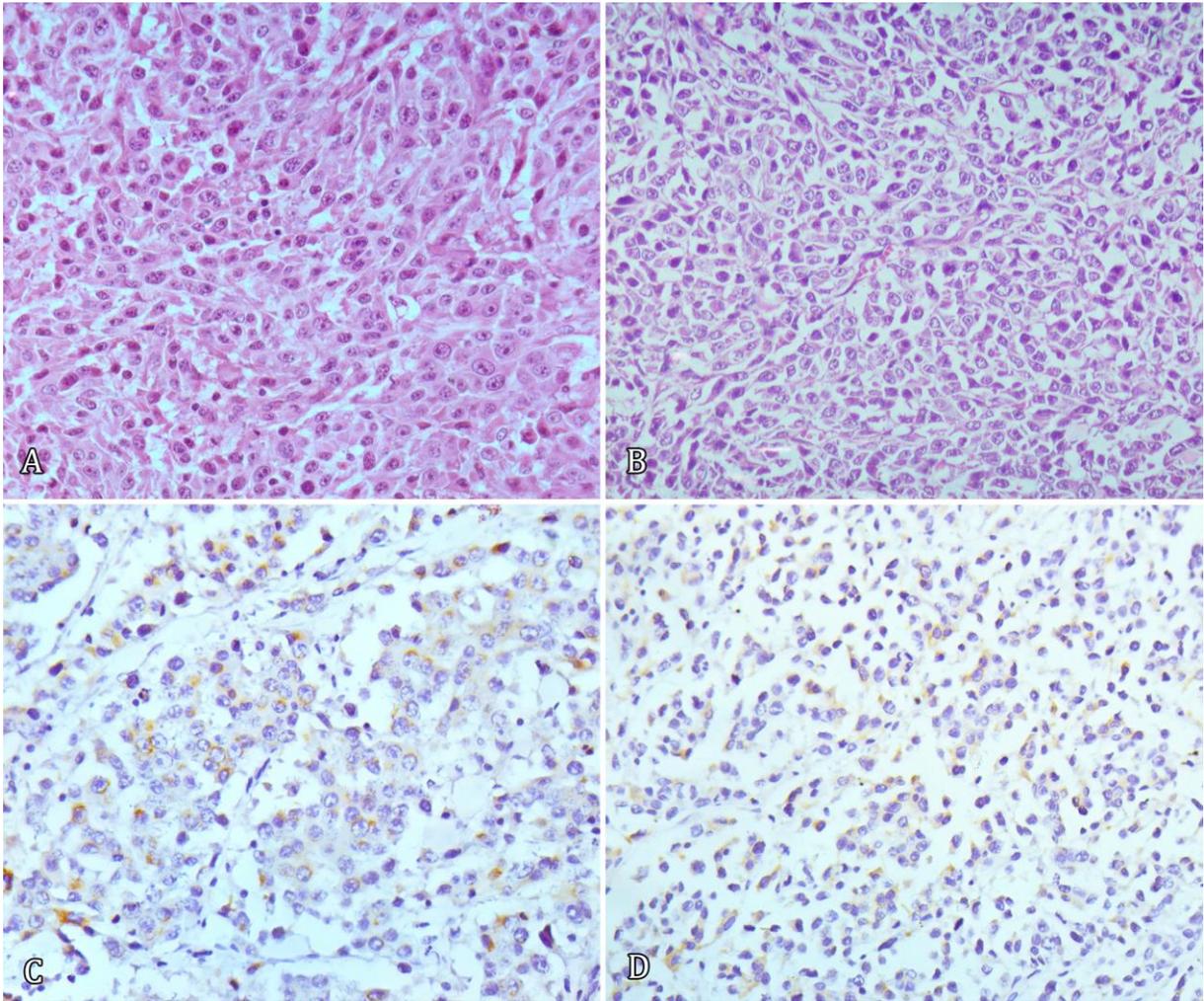


Figura 1: Melanoma melanótico em cão diagnosticado no SAP/UFRRJ. **A-** Nódulo por vezes enegrecido e irregular em cavidade oral de cão, Poodle, diagnosticado com melanoma melanótico. **B-** Nódulo enegrecido medindo cerca de 5cm, retirado de leito ungueal de cão da raça Rottweiler, diagnosticado com melanoma melanótico. **C-** Metástase de melanoma melanótico em pulmão. Observam-se diversos nódulos enegrecidos distribuídos aleatoriamente nos lobos caudais. **D-** Metástase de melanoma melanótico. Nódulo medindo cerca de 3 cm de diâmetro localizado no baço.



Figuras 2: A e B- Pele: Melanoma amelanótico em dois cães HE, 40x. C e D – Imunorreatividade com Melan-A. Contra-coloração Hematoxilina, aumento de 40x.

DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento da medicina veterinária e suas especialidades, além do aumento da expectativa de vida dos cães, procura-se cada vez mais aprimorar as técnicas diagnósticas, prognósticas e o tratamento das mais diversas enfermidades, incluindo as neoplasias.

Alguns estudos têm comparado a biologia molecular entre alguns tipos de neoplasias em animais e humanos, para utilizá-los como modelos experimentais, uma vez que muitos cânceres em cães de estimação mostram características semelhantes ao humano, incluindo aparências clínica e histológica, comportamento biológico, genética tumoral, vias moleculares e resposta a terapias (GARDNER; FENGER; LONDON, 2016; ULVÉ, et al., 2017).

Tumores melanocíticos são bastante comuns no cão, e a maioria deles é maligno (SPANGLER; KASS, 2006; BROCKLEY; COOPER; BENNETT, 2013; GILLARD, et al., 2014). O melanoma cutâneo apresenta significativa relevância entre os tumores malignos de pele. As neoplasias melanocíticas ocorrem com frequência nos cães e correspondem de 6% a

20% do total das neoplasias cutâneas da espécie (GRANDI; RONDELLI, 2016) e 7% de todos os tumores malignos em cães (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Em outro estudo, semelhante ao que foi observado no presente trabalho (7,7% eram melanocitomas), dos mais de 2.350 casos de tumores melanocíticos, 70% eram malignos e 30%, benignos (chamados melanocitomas) (GILLARD, et al., 2014).

Na literatura brasileira, os dados se assemelham aos das pesquisas internacionais. Um levantamento realizado por Rolim (2011) demonstra que 86,3% das neoplasias melanocíticas foram diagnosticadas como melanomas. O local mais frequente do melanoma é a cavidade oral (GILLARD, et al., 2014; HERNANDEZ, et al., 2018), assim como observado por estudos de Goldschmidt e Shofer (1992) em que os locais mais afetados foram cavidade oral (56%), lábio (23%), pele (11%), dígito (8%) e, em menor proporção, o olho (2%), dados que corroboram com este estudo, em que 41,03% dos tumores encontravam-se na cavidade oral e ainda resultaram em fraturas ósseas, disfagia e sangramento (RAMOS-VARA, et al., 2000).

Todos os cães diagnosticados com neoplasias melanocíticas eram adultos com mais de três anos de idade, com média de idade de 10 anos. Dados semelhantes foram observados por Millanta et al. (2002) que concluíram que o melanoma é mais comum em cães adultos a idosos com idade média de 9,8 anos a 11,6 anos. Não há predileção por sexo (BOLON et al. 1990) e este estudo comprova esta afirmativa, uma vez que 41 animais eram fêmeas e 37, machos. Raças com pele pigmentada são mais propensas a desenvolver melanomas, como é o caso de Schnauzer, Terrier, Poodle, Dachshund, Cocker Spaniel e Chow Chow (RAMOS-VARA, et al., 2000; GINN, MANSELL, RAKICH 2007; DOBSON, 2013; GILLARD, et al., 2014; VAN DER WEYDEN, et al., 2016). As raças mais acometidas foram de pequeno porte ou as de pelagem escura ou pele e mucosas pigmentadas. Dentre as raças puras, no presente estudo, Poodle, Dachshund, Cocker Spaniel e Chow Chow corresponderam a 20 animais.

Os autores propuseram que um limiar de índice mitótico de 20 figuras em 10 campos prevê o prognóstico (LAVER et al., 2018). No que se trata de figuras de mitose houve uma média de 10,5 mitoses em 10 campos com aumento de 40x.

O melanoma de leito ungueal é o segundo tumor de dígito canino mais comum após o carcinoma de células escamosas e responde por 15% a 17% das neoplasias nesta localização (HENRY, et al., 2005; WOBESER, et al., 2007). Melanomas em leito ungueal resultaram em 11,54% dos casos e foram a terceira localização mais comum, seguido de cavidade oral e pele.

Os melanomas apresentam-se como tumores únicos, não delimitados, sem presença de cápsula, e sua coloração pode variar de tons acinzentados a castanho-enegrecido, e apresentam divergências de tamanho (SILVA, 2013). O tumor pode apresentar macroscopicamente com aspecto fibroso e superfície ulcerada. Pode ainda apresentar-se hemorrágico, com crescimento rápido e friável (MORRIS; DOBSON, 2007). O tamanho é variável podendo ter milímetros a 10 cm de comprimento com superfície irregular e assimétrica (GRANDI; RONDELLI, 2016). Devido seu surgimento com várias apresentações, na rotina clínica melanomas podem ser confundidos com outros tumores de pele como carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores osteogênicos (GILLARD et al., 2014; NISHIYA et al., 2016). No presente estudo, em alguns casos foi possível ter acesso aos dados referentes ao aspecto macroscópico e a maioria dos tumores foram descritos como enegrecidos (53,70%). Áreas ulceradas foram observadas em 23,50% das neoplasias, superfície irregular em 19,12% e hemorragia em 7,35%. Em relação ao tamanho, este foi descrito em 20 casos e variou de 0,2 a 10 cm.

Com relação à morfologia celular, os melanomas do tipo misto foram os mais comuns, seguidos pelos tipos epitelióide e fusiforme. O tipo histológico, analisado isoladamente, não pode ser levado em consideração para definição do prognóstico (MODIANO et al., 1999) e deve ser avaliado em conjunto com outros fatores (SCHULTEISS, 2006).

Os melanomas fazem metástase para diversos locais em todas as espécies. Os linfonodos, pulmão e fígado são os locais mais comuns (DAY; LUCKE, 2002; LAVER et al., 2018). Em um estudo com 87 cães, 12% apresentaram metástases em linfonodos e 3,7% nos pulmões (LAVER et al., 2018). Metástases cerebral e óssea são menos frequentes (ROVESTI; GUANDALINI; PEIFFER, 2001; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002) e, em outros órgãos abdominais, próstata e miocárdio raramente foi relatado (DAY; LUCKE, 2002; DELGADO et al., 2016). Por se tratar de um estudo retrospectivo, não foi possível assegurar que todas as informações sobre os animais, tais como ocorrência de metástases, estariam disponíveis. Nos arquivos havia relato de metástase em linfonodos de seis cães e quatro animais apresentaram metástases em outros órgãos e o pulmão foi o mais acometido.

CONCLUSÕES

Neoplasias melanocíticas são distribuídas igualmente em ambos os gêneros e acometem predominantemente cães a partir de três anos de idade, com média de 10 anos.

O local mais frequentemente acometido é a cavidade oral, seguido por pele e leito ungueal.

Os aspectos epidemiológicos das neoplasias melanocíticas diagnosticadas no SAP nos últimos 22 anos corroboram com os descritos na literatura.

Melanomas melanóticos do tipo misto foram, com relação ao fenótipo e morfologia, os tipos mais comumente observados.

Agradecimentos.- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração de conflito de interesse.- Os autores não têm interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

- BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007.
- BOLON, B.; CALDERWOOD MAYS, M.B.; HALL, B.J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 96–102, 1990.
- BROCKLEY, L. K.; COOPER, M. A.; BENNETT, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zealand veterinary journal**, v. 61, n. 1, p. 25-31, 2013.
- CAMARGO, L. P; CONCEIÇÃO, L. G; DOS SANTOS COSTA, P. R. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 138-152, 2008.
- CARVALHO, S. L. M. **Trabalho De Conclusão do Curso Medicina Veterinária**. 2005. Disponível em: <<http://www.upis.br/pesquisas/pdf/veterinaria/Silvia%20Luanna%20Mendes%20Carvalho.pdf>>. Acesso em: 31, agosto, 2020.
- CLARKE, L. L.; RISSI, D. R. Malignant rectal melanoma in 2 dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 2, p. 152, 2018.
- DAY, M. J.; LUCKE, V. M. Melanocytic neoplasia in the cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, n. 5, p. 207-213, 2002.
- DELGADO, E; SILVA, J. X; PISSARRA, H; PELETEIRO, M. C; DUBIELZIG, R. R. Late prostatic metastasis of an uveal melanoma in a miniature Schnauzer dog. **Clinical Case Reports**. n. 4:647–652, 2016
- DOBSON, J. M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.
- GARDNER, H. L; FENGER, J. M; LONDON, C. A. Dogs as a Model for Cancer. **Annual review of animal biosciences**. 4, 199-222, 2016.
- GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2014.
- GINN, P. E.; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Skin and Appendages. In: MAXIE, G. (Ed.) **Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. v. 2. Cap. 5, p. 553-782. Philadelphia: Elsevier, 2007.
- GOLDSCHMIDT, M. H. et al. **Skin tumors of the dog and cat**. Pergamon Press Ltd, 1992.
- GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. **Tumors in domestic animals**, v. 5, p. 97e99, 2017.

GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. H. Neoplasias Cutâneas. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. de. **Oncologia em Cães e Gatos**, 2 ed. São Paulo: Roca, p. 339-36, 2016.

HENRY, C. J. et al. Canine digital tumors: a veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 5, p. 720-724, 2005.

HERNANDEZ, B. et al. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 2018.

LAVER, T. et al. Post-surgical outcome and prognostic factors in canine malignant melanomas of the haired skin: 87 cases (2003–2015). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 9, p. 981, 2018.

LUNA, L. D. et al. Feline non-ocular melanoma: a retrospective study of 23 cases (1991–1999). **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 2, n. 4, p. 173-181, 2000.

MEUTEN, D.J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. John Wiley & Sons, 2016.

MILLANTA, F. et al. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 1, p. 45-51, 2002.

MODIANO, J. F.; RITT M. G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *Journal of Veterinary International Medicine*, v. 13, p.: 163-174, 1999.

MORRIS, J.; DOBSON, J. **Oncologia em Pequenos Animais**, São Paulo, p. 105-116, 2007.

NISHIYA, A. T. et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

PATNAIK, A. K.; MOONEY, S. Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 2, p. 105-112, 1988.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340-346, 2011.

ROVESTI, G. L.; GUANDALINI, A.; PEIFFER, R. Suspected latent vertebral metastasis of uveal melanoma in a dog: a case report. **Veterinary ophthalmology**, v. 4, n. 1, p. 75-77, 2001.

SCHULTHEISS, P. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigative**, v. 18, p.: 422 – 425, 2006.

SILVA, K. L. F. Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos. Departamento de Vetrinária. **Universidade de Trás-os-Montes e Alto Moro**, Trás-os-Montes, 2013.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 136-149, 2006.

ULVÉ, R. et al. Discovery of human-similar gene fusions in canine cancers. **Cancer Research**, v. 77, n. 21, p. 5721-5727, 2017.

VAN DER WEYDEN, Louise et al. Cross-species models of human melanoma. **The Journal of pathology**, v. 238, n. 2, p. 152-165, 2016.

WOBESER, B. K. et al. Diagnoses and clinical outcomes associated with surgically amputated canine digits submitted to multiple veterinary diagnostic laboratories. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 3, p. 355-361, 2007.

CAPÍTULO II

Estudo da fração de crescimento tumoral (Ki-67) em neoplasias melanocíticas caninas

Nathália da Silva Carvalho^{1*}, Fernanda de Freitas Alves Vieira¹, Asheley Henrique Pereira¹, Samay Zillmann Rocha Costa², Mariana Bezerra Mascarenhas³ e Vivian de Assunção Nogueira Carvalho¹

¹Setor de Anatomia Patológica (SAP), Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, Brasil. ²Instituto Federal Farroupilha, Campus Frederico Westphalen, Rio Grande do Sul, Brasil. ³Médica Veterinária Autônoma

Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465, Km 07, s/n - Zona Rural, Seropédica - RJ, 23890-000, Brazil. E-mail: nathysc@hotmail.com

RESUMO: As neoplasias melanocíticas originam-se da proliferação de melanoblastos e melanócitos e são nomeadas melanomas, quando malignas e melanocitomas, quando benignas. Os melanomas correspondem a 7% das neoplasias malignas em cães, o que torna essencial estudo acerca destes tumores. Uma vez que expressam comportamento agressivo e histologia variável, exames complementares são necessários para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico. A atividade mitótica pode ser um importante critério de valor prognóstico para os melanomas, pois estima a taxa de proliferação celular. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar a fração de crescimento dessas neoplasias determinado pelo Ki-67 (MIB-1) e correlacioná-lo com a localização e critérios histológicos associados à gravidade. Além disso, objetivou-se estabelecer um método de contagem único e amplo para todos os tipos da neoplasia e suas localizações mais comuns. Realizou-se imuno-histoquímica com Ki-67 em 36 neoplasias e as lâminas foram contracoradas com Giemsa. Destes, 12 apresentaram imunorreatividade: três melanomas amelanóticos, oito melanomas melanóticos e um melanocitoma. Calculou-se a fração de Ki-67 ao contar as células em 10 campos aleatórios de cada lâmina em objetivas de 40x. Após análise estatística, verificou-se que o resultado corroborou com a literatura, visto que a variante maligna apresentou maior fração de crescimento tumoral, maior índice mitótico que a variante benigna e parte das alterações histológicas encontravam-se correlacionadas à imunorreatividade ao Ki-67. Sabe-se que, quando o valor da fração de crescimento tumoral encontra-se $\geq 15\%$, é indicativo de prognóstico desfavorável e está relacionado com índice mitótico ≥ 3 em 10 campos na objetiva de 40x. Em quatro casos de melanomas, a fração de crescimento correspondeu a 15,28%, 15,87%, 19,13%, e 51,3% e os índices mitóticos resultaram 5, 30, 60 e 70. O índice proliferativo determinado pela contagem de mitoses e imunorreatividade ao Ki-67 variou significativamente entre tumores melanocíticos localizados na cavidade oral, pele e dígito. Na variante benigna, a fração de crescimento tumoral foi menor quando comparado com as neoplasias malignas e o método de contagem utilizado neste trabalho mostrou-se efetivo para todos os tipos de neoplasias melanocíticas estudadas independente da localização.

Palavras-chave: anticorpo, caninos, imunohistoquímica, neoplasia.

ABSTRACT: Melanocytic neoplasms originate from the proliferation of melanoblasts and melanocytes and are named melanomas when malignant and melanocytomas when benign. Melanomas account for 7% of malignant neoplasms in dogs, which makes it essential to study these tumors. Since they express aggressive behavior and variable histology, complementary tests are necessary for the establishment of diagnosis and prognosis. Mitotic activity may be an important criterion of prognostic value for melanomas, since it estimates the cell proliferation rate. Thus, the objectives of this study were to evaluate the growth fraction of these neoplasms determined by Ki-67 (MIB-1) and correlate it with the location and histological criteria associated with severity. In addition, we aimed to establish a single and broad counting method for all types of neoplasms and their most common locations. Immunohistochemistry with Ki-67 was performed on 36 neoplasms and the slides were counterstained with Giemsa. Of these, 12 showed immunoreactivity: three amelanotic melanomas, eight melanotic melanomas and one melanocytoma. The Ki-67 growth fraction was calculated by counting the cells in 10 random fields of each slide in 40x objectives. After statistical analysis, it was found that the result corroborated with the literature, since the malignant variant showed higher cell growth fraction, higher mitotic index than the benign variant and part of the histological changes were correlated to Ki-67 immunoreactivity. It is known that when the cell growth fraction value is $\geq 15\%$, it is indicative of unfavorable prognosis and is related to mitotic index ≥ 3 in 10 fields in the 40x objective. In four melanoma cases, the growth fraction corresponded to 15.28%, 15.87%, 19.13%, and 51.3% and the mitotic indices resulted 5, 30, 60, and 70. The growth fraction determined by mitosis count and Ki-67 immunoreactivity varied significantly among melanocytic tumors located in the oral cavity, skin, and digit. In the benign variant, the growth fraction was lower when compared to the malignant neoplasms and the counting method used in this study proved to be effective for all types of melanocytic neoplasms studied regardless of location.

Key words: antibody, canine, immunohistochemistry, neoplasia.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a oncologia é responsável por grande parte dos atendimentos realizados em clínicas e hospitais veterinários. Esta visão tem tornado os médicos veterinários cada vez mais empenhados em encontrar maneiras de descobrir diferentes tratamentos eficazes no combate do câncer e principalmente, aprofundar o estudo sobre biologia molecular dos tumores. Especificamente com relação ao melanoma, nas últimas décadas houve um aumento da frequência em cães, visto que em 1882, Burkero descreveu o primeiro caso de melanoma em cão e, desde então, o aumento da frequência na veterinária motiva cada vez mais o aprofundamento das pesquisas sobre a neoplasia (FERREIRA et al., 1997). Hoje sabe-se que muitas variáveis dentro do tumor influenciam a sobrevida e isso tem sido essencial para o estudo do comportamento e principalmente do prognóstico.

O melanoma representa 7% de todos os tumores malignos em cães (SMITH; GOLDSCHMIDT, 2002), e a localização mais frequente é a cavidade oral, mimetizando melanomas da mucosa humana (GILLARD, et al., 2014; HERNANDEZ, et al., 2018). Com relação à epidemiologia, segundo Withrow et al. (2013). Melanomas caninos também ocorrem na pele, leito ungueal, olho, trato gastrointestinal, sistema nervoso central ou junção mucocutânea (SMITH; GOLDSCHMIDT, 2002; WITHROW; SCHULTHEISS, 2006; VAIL; PAGE, 2013).

O melanoma maligno humano é um câncer altamente heterogêneo que afeta vários sítios anatômicos com diferentes comportamentos clínicos. Origina-se de melanócitos, que são células dendríticas localizadas em epitélios como pele ou mucosa, mas também no olho ou órgãos internos, definindo assim os principais subtipos com localizações anatômicas específicas e patogênese. Os principais subtipos incluem cutâneo (tipos induzidos e não induzidos por raios ultravioletas), melanomas acrais, mucosos e oculares (PROTEAU; ANDRE, 2019). Os melanomas cutâneos em humanos são responsáveis por aproximadamente 75% das mortes por câncer de pele (BASTIAN, 2014; WEISS, et al., 2015), e sua incidência está aumentando entre as populações de ascendência europeia, com 80.000 casos por ano nos EUA (WILLIAMS, 2017).

Allen e Spitz observaram, em 1953, que a espessura do tumor estava associada ao prognóstico do melanoma em humanos. Esse foi o primeiro relato da correlação entre diversas variáveis e o prognóstico do melanoma, onde também verificou-se que a ulceração é um fator prognóstico adverso. Já na década de 50, sugeriram que a presença de mitoses no melanoma era mais frequente nos pacientes que evoluíram para óbito (ALLEN; SPITZ, 1953).

A imuno-histoquímica pode ser uma ferramenta prognóstica de grande utilidade, semiquantitativa e objetiva. O método é cada vez mais usado, além da descrição histológica na oncologia humana por seu valor prognóstico (IDIKIO, 2009).

A proteína Ki-67 foi caracterizada pela primeira vez por Gerdes et al. (1983). Em 1983, na universidade de Kiel na Alemanha, produziram o Ki-67, obtido através da 67ª placa de cultura em tecido, e sendo definido como anticorpo monoclonal de murganho (GERDES et al., 1992). Trata-se de uma IgG1 (imunoglobulina G1) de murganho produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin. A estrutura química do antígeno reconhecido pelo reagente com o Ki-67 é desconhecida. A massa molecular é de 345 a 395 kDa e o cromossoma 10 parece estar envolvido na expressão da proteína que apresenta íntima associação com o ciclo celular (KEY et al., 1993). A imunomarcagem MIB-1 tem-se revelado extremamente importante e eficaz na classificação de tumores e correlação com a sobrevivência dos pacientes em uma variedade de tumores humanos (BROWN; GATTER 1990; MILLANTA et al., 2002). Tem sido também relatada a sua correlação com os parâmetros histológicos relacionados com prognóstico (SOYER, 1991; RIEGER et al., 1993; MILLANTA et al., 2002).

A fração de crescimento tumoral determinada pelo Ki-67, correlaciona-se bem com uma baixa taxa de sobrevivência, tal como a presença de crescimento invasivo e a classificação com base em critérios histológicos (SMITH et al., 2002).

A pKi-67 é encontrada em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase de repouso, e é a característica que lhe permite ser usada como marcador da proliferação celular. Durante as fases do ciclo celular G1, S e G2, a pKi-67 está dentro do nucléolo e associada ao componente fibrilar denso. Durante a mitose, ela desloca-se para a camada pericromossomal (BROWN; GATTER, 2002).

A fração de Ki-67 deve ser reportada como uma porcentagem de núcleos marcados positivamente por 500 células. Neoplasias com uma fração de crescimento tumoral de Ki-67 \geq 15% apresentam um prognóstico desfavorável, e neoplasias com uma fração de Ki-67 $<$ 15% um prognóstico positivo, e estes valores correlacionam-se positivamente com o índice mitótico \geq 3 e $<$ 3 em 10 campos na objetiva de 40X, respectivamente (SMEDLEY et al., 2011; MEUTEN, 2016).

O anticorpo mais utilizado é o MIB-1 (molecular immunology Burstel-1), sendo este anticorpo utilizado em tecidos conservados em formol e incluídos em parafina, o que permite a realização de estudos retrospectivos com base em arquivos histológicos (BROWN; GATTER, 2002).

Os objetivos do trabalho foram estabelecer um método de contagem único e amplo para todos os tipos da neoplasia e suas localizações mais comuns (pele, cavidade oral e leito ungueal), além de correlacionar a fração de crescimento tumoral com a localização, aspectos epidemiológicos e características histopatológicas da neoplasia.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O estudo foi realizado no Laboratório de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (SAP/UFRRJ).

Amostras

Foram realizados exames imuno-histoquímicos em 36 neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no Laboratório de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (SAP/UFRRJ) entre 1999 a 2020. As amostras foram obtidas a partir da revisão e análise criteriosa das fichas e lâminas das necropsias [6/36 (16,66%)] e biópsias [30/36 (83,33%)]. Como critério de inclusão, cada caso deveria possuir blocos de parafina e/ou lâminas, com prévio diagnóstico através da coloração de rotina (hematoxilina e eosina) e apresentar imunorreatividade para o Melan-A (melanomas amelanóticos).

Histopatologia

As neoplasias foram classificadas de acordo com o boletim Médico Veterinário da OMS (1998) em: melanocitomas, melanomas epitelióides, melanomas fusiformes e melanomas mistos. Uma segunda classificação baseada no fenótipo dividiu as neoplasias em

melanoma, melanoma amelanótico, melanoma parcialmente melanótico (pouco pigmento observado). Características como a contagem de mitose em 10 campos de 40x, atipia nuclear leve (+), moderada (++) ou acentuada (+++), pleomorfismo leve (+), moderado (++) ou acentuado (++), nucléolos múltiplos, evidente ou pouco evidente, morfologia (epitelióide, fusiforme ou misto), presença de atividade juncional e ainda, pigmentação como pouca (+), moderada (++) , acentuada (+++) ou nenhuma, também foram avaliadas.

Imuno-histoquímica

Anticorpo Ki-67

As secções histológicas de 36 casos foram desparafinadas, hidratadas e incubadas em peróxido de hidrogênio a 3%, para bloqueio das peroxidases endógenas. Após a lavagem, as lâminas ficaram submersas em tampão EDTA tris em pH 9.0 por 20 min em banho-maria a 96°C para recuperação antigênica. O bloqueio de reações inespecíficas foi realizado com leite desnatado a 5% (Molico® - Indústria Brasileira) por 30 min. Os cortes foram incubados em estufa a 37 graus Celsius com o anticorpo Ki67 (Clone MIB-1 - Dako) pelo período de duas horas. O sistema de detecção utilizado foi o EnVision Flex/HRP - Dako e como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB). Todas as secções foram contra coradas Giemsa para diferenciação do pigmento melânico da imunomarcagem e avaliadas em microscópio óptico.

Para contracoloração com Giemsa, na sequência do cromógeno DAB, as lâminas foram lavadas em água por cinco minutos, depois de retirar a água, foram cobertas por Giemsa diluído a 20% (à base de água) por 30 minutos. O excesso de Giemsa foi removido e as lâminas passaram por um banho rápido (2-3 passagens) em ácido acético a 1% (à base de água). Sequencialmente, as lâminas foram lavadas em álcool absoluto três vezes e submersas por um minuto em álcool isopropílico e deixadas para secar na estufa por 30 minutos. As lâminas foram então montadas de acordo com a rotina do laboratório. No microscópio, o pigmento melânico aparece como uma mancha verde a enegrecida, enquanto o cromógeno DAB será observado em marrom. Para controle positivo, utilizou-se um caso de mastocitoma de alto grau e, como controle negativo, o mesmo caso foi utilizado, porém incubado com PBS (Tampão fosfato-salino).

Fração de crescimento tumoral - Ki-67

A fração de crescimento foi avaliada em microscópio óptico Axio Scope. A1- Zeiss Field Number 22 após seleção e contagem de 10 campos com aumento de 40x, segundo técnica descrita por Smedley et al. (2011) e Silva (2013). A contagem foi realizada de forma manual em 10 campos aleatórios, considerando a razão de células positivas/não positivas e posterior cálculo da porcentagem. Considerou-se que, em cada lâmina, havia cerca de 500 células por campo no aumento de 40x (SMEDLEY et al., 2011; MEUTEN, 2016).

Análise estatística

Foram conduzidas análises para avaliar a marcação de células imunorreativas ao Ki-67 em diferentes amostras de neoplasias melanocíticas em cães, realizando o teste ANOVA e considerando $p < 0.005$.

Para testar a eficácia do anticorpo, entre as diferentes variáveis, como presença de pigmento, local da neoplasia, presença de úlcera, hemorragia, necrose, inflamação, sexo, raça, idade e classificação histológica, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 5%. A normalidade e a homoscedasticidade dos dados foram testadas com os

testes de Kolmogorov–Smirnov e Levene, respectivamente. Os dados foram transformados por $\log(x+1)$.

Por fim, o teste de Tukey foi conduzido nas análises que resultaram em diferenças significativas, com a finalidade de sinalizar as diferenças específicas dentro dos grupos.

Para testar a relação da marcação em células neoplasias e o total de mitoses contadas, foi conduzido teste de correlação de Pearson.

Todas as análises foram conduzidas no R (R for Windows 4.0.3) com o auxílio da interface gráfica RStudio (v1.3.1093) e o uso dos pacotes FSA v0.8.31; car v3.0-10; agricolae v1.3-3 e os gráficos foram construídos com o pacote do R ggplot2 v3.3.2.

RESULTADOS

Histopatologia

Dos 36 cães diagnosticados com neoplasia melanocítica no SAP/UFRRJ, três apresentaram melanomas amelanóticos, 30 melanomas melanóticos e três melanocitomas.

Imuno-histoquímica

Dos 36 casos, 12 apresentaram imunorreatividade ao Ki-67 (33,33%) após contracoloração com Giemsa (Figura 3).

Fração de crescimento tumoral

Quatro dos 12 casos em que houve marcação nuclear com anticorpo Ki-67 possuíam fração de crescimento superior a 15%. Destes, um localizava-se na cavidade oral (25%), um na orelha (25%) e outros dois (um amelanótico) na pele (50%).

O número de células positivas em cada caso assim como os demais dados epidemiológicos e histopatológicos encontram-se listados nos quadros abaixo (Quadros 2, 3 e 4).

Quadro 2: Comparação entre a fração de crescimento tumoral e demais características histopatológicas em relação ao diagnóstico e localização das neoplasias

SAP	Diagnóstico	Localização	Índice (%)	Mitose	Atipia	Pleomorfismo
33904	Melanoma Amelanótico	Cav Oral	6,17	50/10	+	Moderado
34146	Melanoma Amelanótico	Pele	15,87	60/10	++	Acentuado
34199	Melanoma parc melanótico	Cav Oral	10,09	40/10	+	Moderado
34562	Melanoma Amelanótico	Leito ungueal	13,36	25/10	+	Moderado
34635	Melanoma	Cav Oral	4,39	13/10	+	Moderado
34936	Melanoma parc melanótico	Cav Oral	3,44	12/10	+	Acentuado
34983	Melanoma parc melanótico	Cav Oral	2,62	11/10	++	Acentuado
35030	Melanoma parc melanótico	Cav Oral	19,13	5/10	+	Acentuado
36034	Melanocitoma	Cav Oral	1,82	10/10	+	Discreto
36204	Melanoma parc melanótico	Orelha	15,28	70/10	++	Acentuado
36446	Melanoma	Pele	6,03	60/10	+	Acentuado
36649	Melanoma	Pele	51,3	30/10	++	Moderado

Cav: cavidade; **parc:** parcialmente; **+**: leve; **++:** moderado

Quadro 3: Dados epidemiológicos, diagnóstico e contagem de células positivas para Ki-67 em neoplasias melanocíticas

SAP	Contagem Celular	Localização	Sexo	Idade	Raça	Diagnóstico
33904	101/10	Cavidade oral	Fêmea	11	SRD	Melanoma Amelanótico
34146	326/10	Pele	Fêmea	13	Poodle	Melanoma Amelanótico
34199	102/10	Cavidade Oral	Macho	12	Poodle	Melanoma parcialmente melanótico
34562	135/10	Leito Ungueal	Fêmea	8	Rottweiler	Melanoma Amelanótico
34635	65/10	Cavidade Oral	Fêmea	11	Yorkshire	Melanoma Melanótico
34936	56/10	Cavidade Oral	Macho	13	Chow Chow	Melanoma parcialmente melanótico
34983	57/10	Cavidade Oral	Fêmea	8	SRD	Melanoma parcialmente melanótico
35030	162/10	Cavidade Oral	Macho	10	Yorkshire	Melanoma parcialmente melanótico
36034	33/10	Cavidade Oral	Fêmea	9	Daschund	Melanocitoma
36204	374/10	Orelha	Fêmea	9	Labrador	Melanoma parcialmente melanótico
36446	72/10	Pele	Fêmea	-	SRD	Melanoma

						Melanótico
36649	513/10	Pele	Macho	14	Beagle	Melanoma Melanótico
35584	-	Pele	Macho	15	SRD	Melanoma parcialmente melanótico
34919	-	Pele	Macho	7	Pinscher	Melanocitoma
194/03	-	Cavidade Oral	Macho	12	SRD	Melanoma Amelanótico
35164	-	Pele	Fêmea	15	SRD	Melanoma parcialmente melanótico
164/14	-	Cavidade Oral	Fêmea	7	Poodle	Melanoma parcialmente melanótico
101/05	-	Cavidade Oral	Macho	11	Rottweiler	Melanoma Melanótico
34268	-	Cavidade Oral	Fêmea	5	Rottweiler	Melanoma parcialmente melanótico
33995	-	Pele	Fêmea	10	Pinscher	Melanoma Melanótico
34245	-	Cavidade Oral	Fêmea	7	Shar Pei	Melanoma Melanótico
194/13	-	Pele	Fêmea	10	SRD	Melanoma Melanótico
14/12	-	Cavidade Oral	Fêmea	12	Poodle	Melanoma Melanótico
360/14		Cavidade Oral	Macho	15	SRD	Melanoma Melanótico

273/15	-	Diversos órgãos	Macho	Adulto	Golden Retriever	Melanoma Melanótico
109/10	-	Pele	Fêmea	14	Daschund	Melanoma Melanótico
34506	-	Pele	Macho	10	Rottweiler	Melanoma parcialmente melanótico
128/06	-	Cavidade Oral	Fêmea	17	Poodle	Melanoma Melanótico
130/06	-	Pele	Macho	10	Dobermann	Melanoma Melanótico
103/08	-	Cavidade Oral	Macho	15	Dobermann	Melanoma Melanótico
17/009	-	Pele	Macho	8	Rottweiler	Melanoma parcialmente melanótico
299/11	-	Cavidade Oral	Fêmea	8	SRD	Melanoma Melanótico
33759	-	Pele	Macho	8	Beagle	Melanoma Melanótico
33172	-	Cavidade Oral	Macho	17	NI	Melanoma parcialmente melanótico
36147	-	Pele	Fêmea	9	SRD	Melanocitoma
33490	-	Pele	Fêmea	15	SRD	Melanoma Melanótico

NI: não informado; SRD: sem raça definida.

Quadro 4: Características histopatológicas das neoplasias melanocíticas em que foram realizados exames imuno-histoquímicos com Ki-67

SAP	Mitose	Atipia Nuclear	Pigmento	Nucléolos	Pleomorfismo	Morfologia	AJ	Diagnóstico
33904	50/10	+	-	Múltiplos	++	Misto	-	Melanoma Amelanótico
34146	60/10	++	-	Múltiplos	+++	Epitelióide	-	Melanoma Amelanótico
34199	-	+	+	Evidente	++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
34562	25/10	+	-	Múltiplos	++	Epitelióide	-	Melanoma Amelanótico
34635	13/10	+	++	Evidente	++	Misto	-	Melanoma Melanótico
34936	12/10	+	+	Múltiplos	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
34983	11/10	++	+	Evidente	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
35030	5/10	+	+	Múltiplos	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
36034	-	-	++	Pouco Evidente	+	Misto	-	Melanocitoma
36204	70/10	++	++	Múltiplos	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
36446	60/10	+	++	Múltiplos	+++	Epitelióide	-	Melanoma Melanótico
36649	30/10	++	+++	Evidente	++	Epitelióide	-	Melanoma

								Melanótico
35584	6/10	+	+	Evidente	++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
34919	-	+	+	Pouco Evidente	+	Misto	-	Melanocitoma
194/03	10/10	+	-	Evidente	+++	Misto	-	Melanoma Amelanótico
35164	10/10	+	+	Evidente	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
164/14	20/10	+	+	Múltiplo	++	Epitelióide	-	Melanoma parcialmente melanótico
101/05	10/10	+	-	Pouco Evidente	++	Fusiforme	-	Melanoma Melanótico
34268	10/10	+	++	Múltiplos	++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
33995	30/10	++	+	Múltiplos	+++	Misto	+	Melanoma Melanótico
34245	12/10	+	++	Evidente	+++	Epitelióide	-	Melanoma Melanótico
194/13	10/10	+	++	Evidente	+++	Misto	-	Melanoma Melanótico
14/12	10/10	-	++	Evidente	++	Epitelióide	-	Melanoma Melanótico
360/14	10/10	+	++	Evidente	++	Misto	-	Melanoma Melanótico
273/15	14/10	+	+	Evidente	++	Misto	-	Melanoma Melanótico

109/10	10/10	+	++	Pouco Evidente	+	Epitelióide	-	Melanoma Melanótico
34506	10/10	+	-	Multiplos	++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
128/06	8/10	-	++	Pouco Evidente	+	Misto	-	Melanoma Melanótico
130/06	22/10	+	+	Evidente	++	Misto	-	Melanoma Melanótico
103/08	7/10	-	+	Pouco Evidente	+	Epitelióide	-	Melanoma Melanótico
17/009	9/10	++	+	Múltiplos	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
299/11	11/10	++	+	Evidente	++	Misto	+	Melanoma Melanótico
33759	9/10	+	++	Evidente	++	Misto	+	Melanoma Melanótico
33172	40/10	++	+	Múltiplos	+++	Misto	-	Melanoma parcialmente melanótico
36147	7/10	-	+	Pouco Evidente	+	Epitelioide	+	Melanocitoma
33490	11/10	-	+	Evidente	+	Misto	-	Melanoma Melanótico

AJ: Atividade Juncional; +: leve/discreto; ++: moderado; +++ acentuado; -: não observado.

Análise Estatística

A relação entre o total de células marcadas e o diagnóstico foi significativa ($p=0.015$), e os indivíduos com diagnóstico de melanoma, melanoma amelanótico e melanoma parcialmente melanótico apresentaram mais imunorreatividade que os melanocitomas (Gráfico 3).

A cavidade oral foi o local com maior número de casos com imunorreatividade para Ki-67, nos nódulos das regiões da orelha e da pele, entretanto ao serem analisados de forma individual, houve maior número de células positivas ($p=1.7e^{-17}$). Isso pode ser explicado pela agressividade dessas neoplasias nos referidos locais (Gráfico 4).

Outra característica diretamente relacionada ($p=3$ e -15) com o total de células positivas foi a atipia nuclear (Gráfico 5). As amostras com presença evidente e múltipla de nucléolos tiveram maior imunorreatividade pelo anticorpo ($p=0.014$), principalmente quando comparado com as amostras que tiveram nucléolos pouco evidentes (Gráfico 5).

O teste ANOVA revelou diferença significativa ($p=8.7$ e -15) entre os diferentes níveis de pigmentação, com posterior separação em três grupos distintos. As amostras com muita pigmentação possuíam os maiores valores de marcação de células, enquanto as amostras sem pigmentação e parcialmente melanóticas (+ ou ++) são mais parecidas entre si (Gráfico 5).

A relação entre o total de células marcadas e a presença de hemorragias também foi significativa ($p=0.013$). Ou seja, as amostras de cães que apresentavam hemorragia, possuíam mais marcações do que aqueles que não apresentaram (Gráfico 7).

Em relação ao pleomorfismo, constatou-se que as amostras com a maior marcação de núcleos pelo anticorpo estão significativamente relacionadas ($p=0.02$) com níveis acentuados e moderados desta variável (Gráfico 6). Da mesma forma, as amostras com necrose tiveram mais marcações do que as que não apresentavam necrose ($p=0.001$) (Gráfico 7).

Já em relação às raças, Beagle e Labrador apresentaram mais imunomarcagem em suas amostras ($p<2.2$ e -16) e a análise de Tukey evidenciou a formação de quatro grupos distintos de raças de acordo com a quantidade de células marcadas em suas amostras.

Quando comparado o sexo dos animais, não houve diferença entre machos e fêmeas ($p=0.051$). Por fim, os indivíduos com ausência de ulcerações possuíam as amostras com maior número de imunomarcagem ($p=0.041$).

A correlação de Pearson evidenciou, significativamente ($p=1.2$ e -05), uma relação positiva ($R=0.39$) entre imunomarcagem pelo Ki-67 e o índice mitótico (Gráfico 8).

Gráfico 3. Box-plot da análise de variância (ANOVA) entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki-67 e o diagnóstico clínico. Os pontos no gráfico indicam outliers. **mel)** Melanoma. **ma)** Melanoma Amelanótico. **mpm)** Melanoma parcialmente melanótico. **mlctm)** melanocitoma

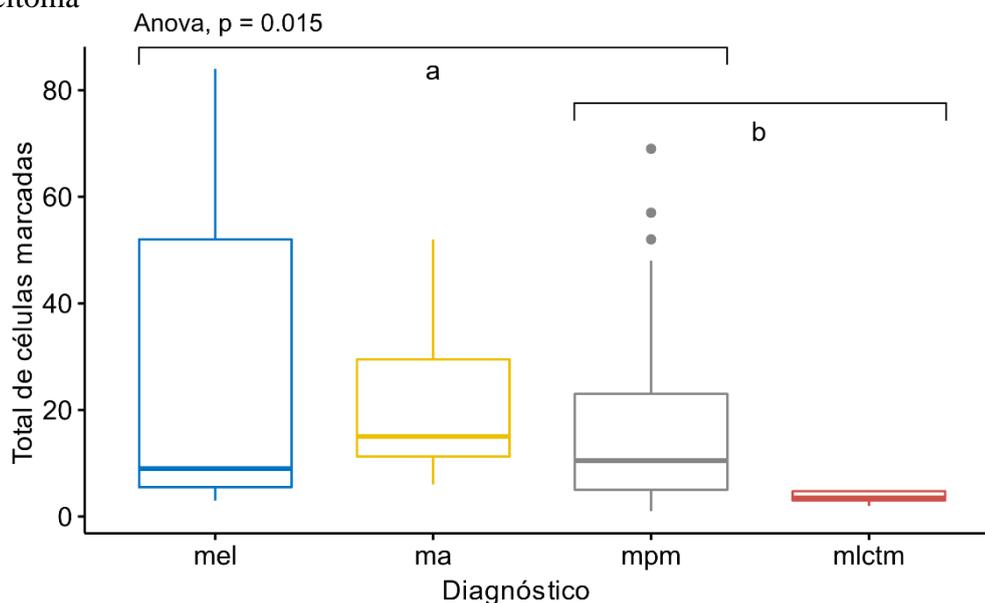


Gráfico 4. Box-plot da análise de variância (ANOVA) entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki-67 e o local de incidência do melanoma. Os pontos no gráfico indicam outliers. **Cav. Oral)** Cavidade oral; **Lei. Ung)** Leito ungueal

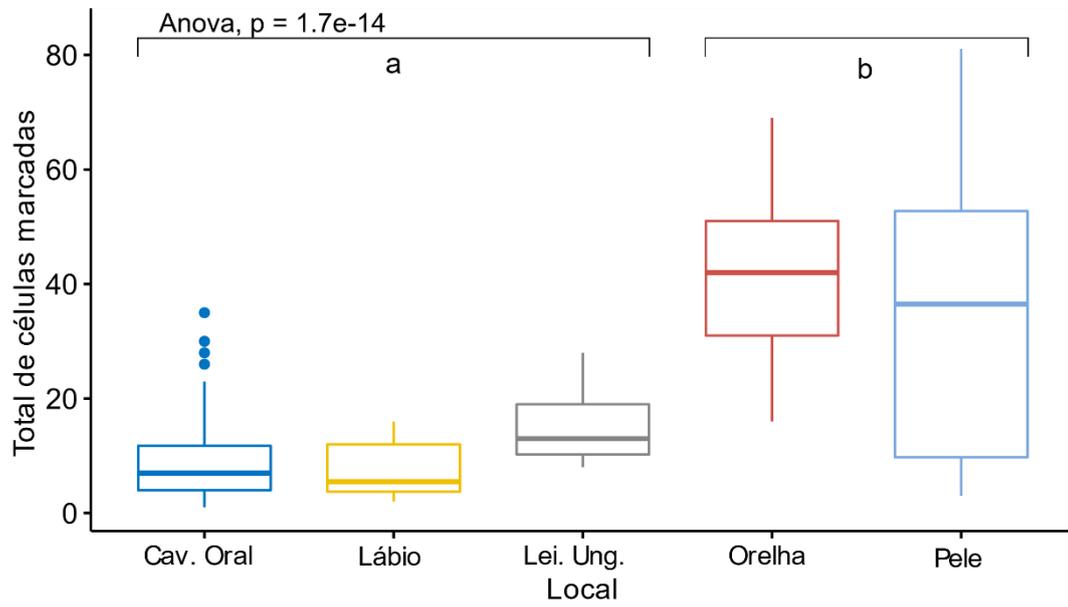


Gráfico 5. Abundância absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. **A)** Diagnóstico; **B)** Presença de pigmentos; **C)** Atipia nuclear e **D)** Morfologia do nucléolo

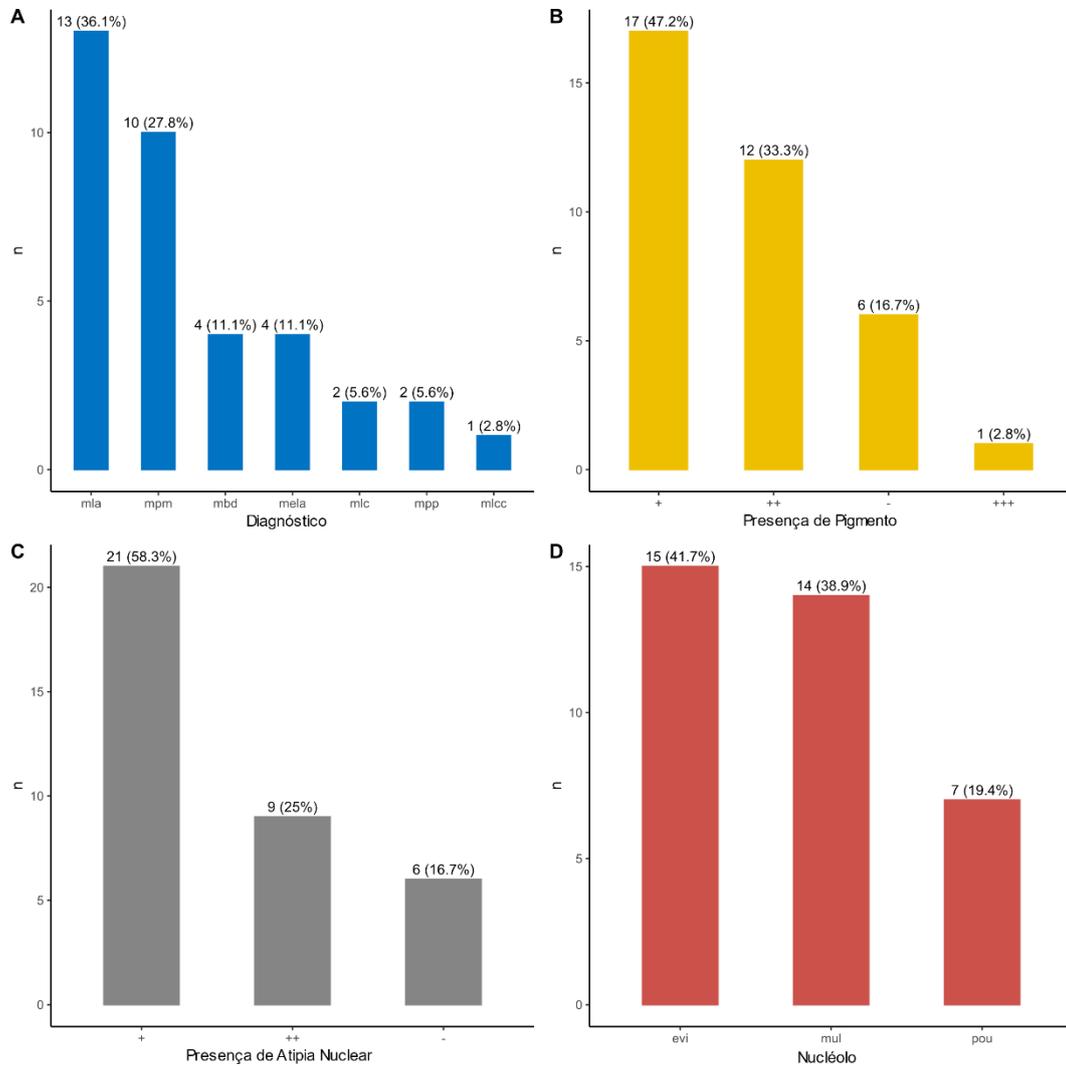


Gráfico 6. Abundância absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. **A)** Pleomorfismo; **B)** Morfologia; **C)** Atividade juncional e **D)** Ulceração

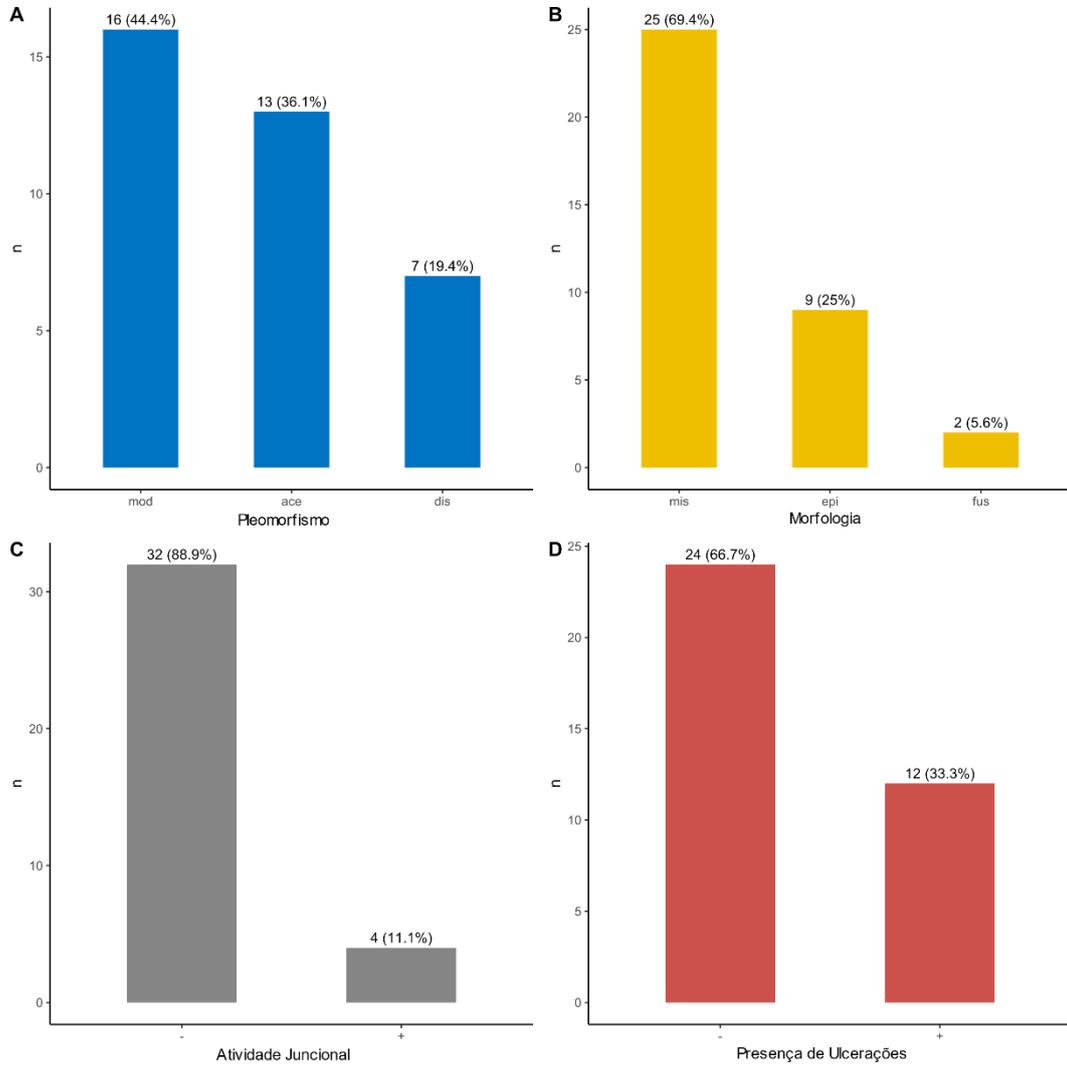


Gráfico 7. Abundância absoluta e relativa de casos em cada variável estudada. **A)** Necrose; **B)** Hemorragia e **C)** Inflamação

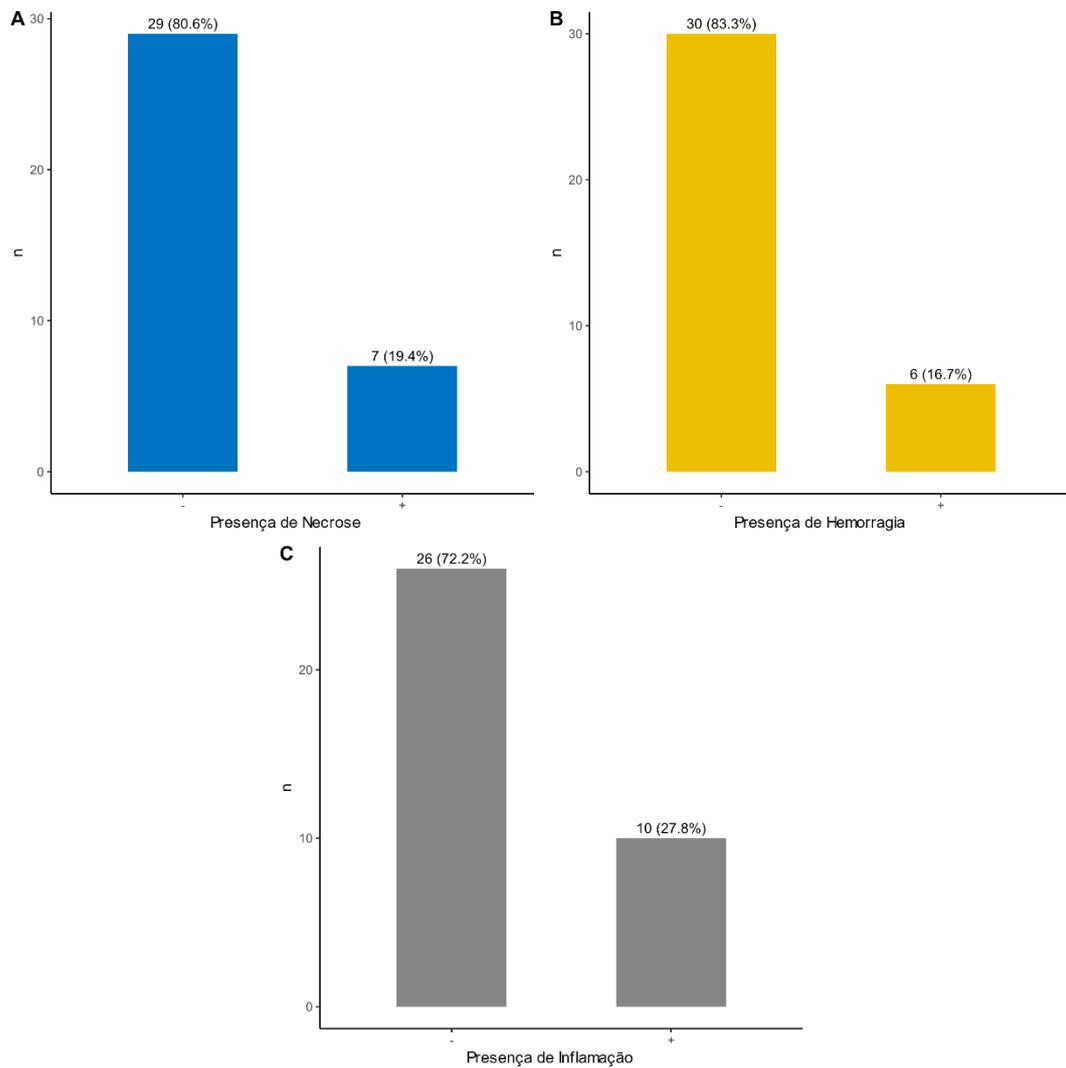
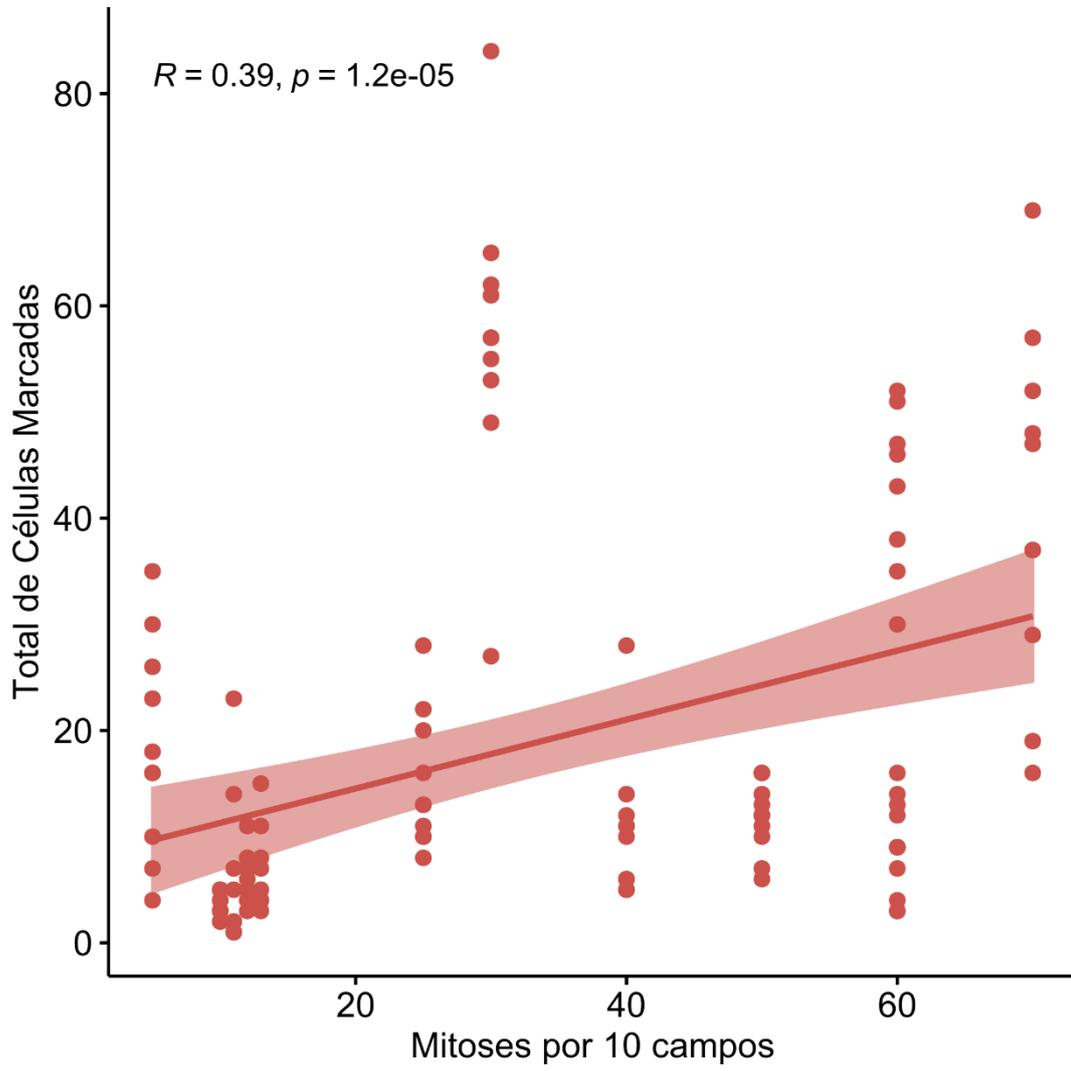


Gráfico 8. Correlação de Pearson entre o total de células marcadas pelo anticorpo Ki67 e a quantidade de mitoses por 10 campos



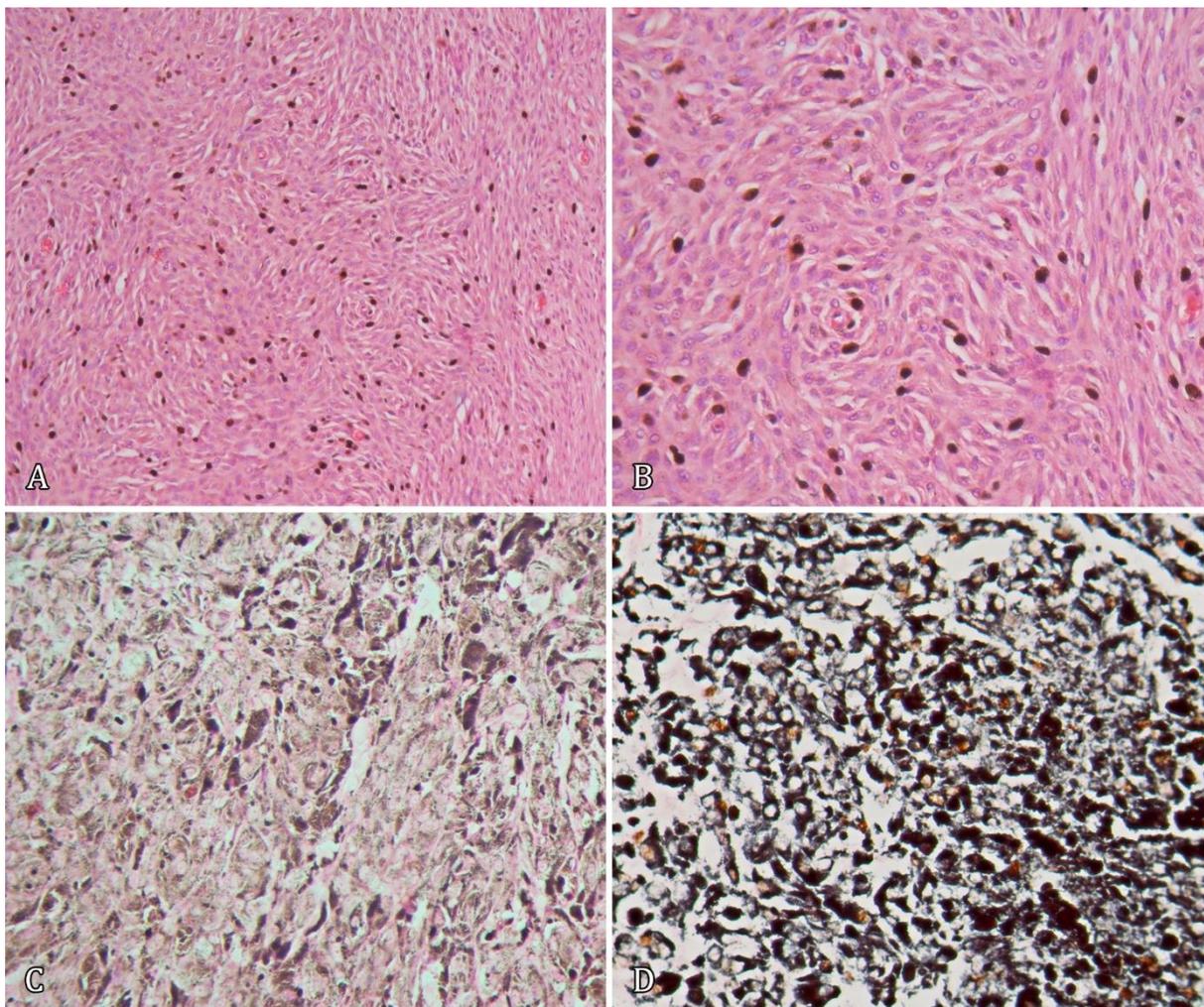


Figura 3: A- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma parcialmente melanótico, aumento de 20x. B- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma parcialmente melanótico, aumento de 40x. C- Imunorreatividade (Ki-67) em melanocitoma, aumento de 40x. D- Imunorreatividade (Ki-67) em melanoma melanótico, aumento de 40x. Contra-coloração com Giemsa.

DISCUSSÃO

As neoplasias em cães apresentam maior semelhança genética com as dos seres humanos do que outras espécies (KIRKNESS, 2003), o que os tornam um modelo interessante a ser investigado para o câncer humano (PINHO et al., 2012). Além disso, pela proximidade com humanos, os cães compartilham fatores de risco ambientais semelhantes (VAIL; MACEWEN, 2000). Sabe-se que em humanos e cães a técnica de imunohistoquímica é útil na diferenciação de neoplasias melanocíticas e não melanocíticas, na identificação do grau de malignidade tumoral e classificação das neoplasias de acordo com a marcação imunohistoquímica para anticorpo específico (LANDMAN, 2011). Desta forma, estudos nas áreas da patologia e oncologia veterinárias são fundamentais não só para auxiliar no diagnóstico e prognóstico das doenças, mas também servir como modelo de estudo para a medicina humana.

Dentro do melanoma, a variante maligna é mais prevalente (76,9%) em comparação com o melanocitoma (23,1%) (TEIXEIRA et al., 2010). Como regra geral, os melanomas decorrentes da pele com pelos são considerados benignos, enquanto os de origem

mucocutânea são tipicamente malignos (SMITH et al., 2002; GILLARD et al., 2014; NISHIYA et al., 2016; MOULTON, 2017). Neste estudo, o melanoma de cavidade oral foi o mais frequentemente observado, seguido pelo de pele e posteriormente, o de leito ungueal.

Antes da definição exata de um prognóstico, um diagnóstico definitivo deve ser estabelecido (SMEDLEY et al., 2011). No caso dos melanomas, o diagnóstico é geralmente feito por avaliação histológica. A histopatologia permite determinar o índice mitótico, que é altamente preditivo do grau de malignidade (aproximadamente 90% de precisão) (WITHROW; VAIL, 2007; MOULTON, 2017). Todos os casos avaliados na imuno-histoquímica obtiveram diagnóstico prévio de melanoma ou melanocitoma e, naqueles onde havia a ausência de pigmento, foi realizada a imuno-histoquímica com anticorpo Melan-A afim se assegurar o diagnóstico.

Ao analisar de forma criteriosa as lâminas dos 36 casos, os melanomas foram classificados de acordo com a morfologia em epitelióide (27,77%), fusiforme (2,77%) e misto (69,44%), e o último tipo foi o mais observado neste estudo. Segundo Cowell e Valenciano, (2014), tumores de origem melanocítica são grandes imitadores de outros tumores, pois eles podem mostrar características de células redondas, células epiteliais ou mesmo células mesenquimais e muitas vezes uma mistura dessas três aparências morfológicas estará presente em um único tumor.

No estudo retrospectivo observou-se maior ocorrência de melanomas melanóticos ou parcialmente melanóticos (80,55%). Os agregados de pigmento de melanina também são uma característica comum (VEENA et al., 2012; PALANIVELU et al., 2013). O pigmento de melanina é um fator limitante na imuno-histoquímica do melanoma porque pode reduzir a imunorreação se estiver na mesma célula que o antígeno (Ag) examinado (ELIAS, 2003). A melanina no citoplasma de macrófagos ou em células de melanomas pode ser confundida porque a cor do pigmento é a mesma que resulta quando é usado DAB em contracoloração com hematoxilina, o que pode interferir na visualização de reações nucleares e torna a análise incerta, além de dificultar a interpretação precisa (RAMOS-VARA, 2000; MATOS, 2010). De fato, a presença do pigmento melânico foi um fator limitante para a interpretação de alguns casos. Segundo Elias (2003) um método alternativo é o uso de permanganato de potássio para bloquear a melanina, porém a reação pode danificar certos epítomos das células prejudicando a imunorreação. Durante o estudo, dois casos passaram pela clarificação mais de uma vez, e os cortes foram danificados.

A análise de fatores como a atividade proliferativa e apoptótica caracterizam o perfil biológico dos tumores e pode influenciar no prognóstico dos pacientes (SCULLY et al., 2000). No presente estudo seguimos o mesmo propósito e buscamos estabelecer um prognóstico confiável e investigar novos fatores de prognóstico que incluem as características histológicas do tumor (ROELS et al., 1999).

Nos tumores melanocíticos, a localização exerce uma influência direta sobre o prognóstico (SPANGLER; KASS, 2006), ou seja, as neoplasias localizadas na cavidade oral, junções mucocutâneas e leito ungueal são potencialmente malignas (BERGMAN et al., 2003; BERGMAN et al., 2006) e há diminuição da sobrevivência quando comparado com a localização dérmica (MILLANTA et al., 2002). Os tumores melanocíticos cutâneos normalmente apresentam um comportamento benigno e, por conseguinte, um melhor prognóstico (SMITH et al., 2002). Spangler e Kass (2006) encontraram mortalidade de 68% em cães com melanoma em cavidade oral e 7% em cães com melanoma de pele. Devido ao estudo retrospectivo, não foi possível acompanhar o tempo de sobrevivência dos animais, porém, com base nas análises histopatológicas, as neoplasias de cavidade oral, mostraram um pior prognóstico, principalmente ao analisar o índice mitótico (todos os casos de cavidade oral possuíam ao menos 10 mitoses em 10 campos de 40x).

De acordo com Spangler e Kass (2006), a atipia nuclear revelou ser a característica histopatológica com maior valor prognóstico no caso dos melanomas orais. Já os melanocitomas, cujo comportamento é benigno, apresentaram na sua maioria grau 1 de atipia, o que corrobora com o observado no presente trabalho.

No melanoma cutâneo do cão, a fração proliferativa determinada pelo Ki-67 tem maior valor prognóstico do que a histologia clássica (91%). Isto sugere fortemente que a utilização de Ki-67 no melanoma cutâneo deve ser normalmente realizada após o diagnóstico histopatológico (BERGMAN et al., 2007). Observou-se, neste estudo, que um caso de melanoma em pele possuiu uma elevada taxa de proliferação celular, quando comparado a outros casos de cavidade oral que, na histopatologia, possuíam características de malignidade mais exacerbadas. Por outro lado, a determinação da fração de crescimento pelo Ki-67 poderá também ser útil na distinção entre tumores benignos e malignos (OHSIE et al., 2008). Baseado nos dados estatísticos foi possível observar que a proliferação celular foi mais significativa nos melanomas malignos que nos benignos. No melanoma oral do cão, uma fração proliferativa determinada pelo Ki-67, superior a 15%, parece estar associada a taxas de sobrevida inferiores a 1 ano (BERGIN et al., 2011). Dos casos positivos localizados na cavidade oral (7/12), um apresentou índice de proliferação superior a 15%.

Os resultados do presente estudo contrariam os obtidos por Millanta et al. (2002), em que o MIB-1 foi estatisticamente superior em melanomas orais do que nos cutâneos e corrobora com o relatado por Sevastre et al. (2012). Um estudo realizado em cães demonstrou que os melanocitomas apresentaram imunorreatividade para o Ki-67 quatro vezes menor que os melanomas malignos (MILANTTA et al., 2002). Dentre os casos em que houve imunorreatividade para o Ki-67, a maioria era de cavidade oral, porém em relação à marcação da proliferação celular, no presente estudo, um caso de melanoma cutâneo se destacou pela alta quantidade de células com marcação positiva. Ao considerar essa informação, pode-se afirmar que a proteína Ki-67 deve ser utilizada em conjunto com outros parâmetros, como o índice mitótico para assegurar uma análise precisa do tumor na base no potencial proliferativo (ELSTON et al., 1993; SPYRATOS et al., 2002).

Não houve associação estatística entre a imunorreatividade pelo Ki-67 e a presença de atividade juncional. Dados semelhantes foram encontrados por Sevastre et al. (2012) em que também não foram encontradas correlações entre a fração de crescimento e o índice mitótico com linfócitos infiltrantes nos melanomas orais e cutâneos. Por outro lado, Spangler e Kass (2006), verificaram que, nos tumores malignos, a presença da atividade juncional pode causar um impacto negativo na sobrevida dos animais.

A atipia nuclear está correlacionada a imunorreatividade ao Ki-67 em todos os tumores melanocíticos, o que contraria o observado por Millanta et al. (2002) em que o grau de atipia não foi significativo. Um alto grau de atipia nuclear está associado a um mau prognóstico, e pouca ou nenhuma atipia está associado a um prognóstico favorável (SPANGLER; KASS, 2006; BERGIN et al., 2011), no entanto, a avaliação deste parâmetro está sujeita a variação interobservador e por isso, o grau de atipia nuclear foi avaliado para as neoplasias melanocíticas com base nos critérios descritos por Spangler e Kass (2006), sempre pelo mesmo observador (SMEDLEY et al., 2011). O grau de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário não apresentou valor prognóstico, fato já observado em estudos anteriores (HAHN et al., 1994).

Smedley et al. (2011) descrevem que a ulceração das neoplasias melanocíticas cutâneas está associada com um tempo de sobrevivência significativamente menor ($p=0,023$) e outros autores também mencionam que trata-se de um fator prognóstico independente ($p=0,065$) (LAPRIE et al., 2001). Por outro lado, não foi observada correlação entre ulceração e a imunorreatividade ao Ki-67, fato já descrito por outros autores para tumores melanocíticos com localização oral, cutânea ou no leito ungueal (SCHULTHEISS et al., 2006; SMEDLEY

et al., 2011). Não foi possível, neste estudo, correlacionar presença de áreas ulceradas com o desfecho clínico.

Seguindo a técnica de Bergin et al. (2011), os núcleos marcados positivamente para Ki-67 foram contados em objetivas de 40x em ocular com retícula, e as áreas sob a região de ulceração foram evitadas (SMEDLEY et al., 2011). A escolha da contracoloração seguiu o protocolo descrito por Ramos-Vara (2005) para imuno-histoquímica de melanomas, uma vez que Giemsa é mais estável do que Azure B para evidênciação da imunorreatividade.

A localização tem sido ao longo dos anos um importante fator prognóstico (BOLON; CALDERWOOD; HALL, 1990). Melanomas em mucosas (principalmente na cavidade oral) são os locais historicamente considerados malignos, porém dados adicionais sugerem que um pequeno subconjunto de tumores orais e labiais são, do ponto de vista microscópicos, bem diferenciados e podem se comportar de forma benigna (ESPLIN, 2008). Apesar da maioria dos casos que apresentaram imunorreatividade estarem localizados na cavidade oral, tais dados podem justificar o comportamento menos agressivo de alguns destes, com bases nos achados histológicos e posterior imuno-marcação com Ki-67.

Este anticorpo pode ser utilizado em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina, o que facilita claramente os estudos da cinética celular em uma variedade de tumores, entretanto existem fatores técnicos, como a fixação, a diluição do anticorpo, os sistemas de detecção, os métodos de pré-tratamento que podem influenciar os resultados e causar variações entre os diferentes estudos (YANG et al., 1996). Por tratar-se de um estudo retrospectivo, durante a realização da técnica, situações descritas acima foram, por vezes, observadas.

A proliferação celular se apresenta como uma característica comum de células malignas e visto isso, a imuno-histoquímica para a expressão da proteína Ki-67 tem sido uma importante ferramenta no prognóstico e tratamento do câncer (KAUSCH et al., 2003). O índice mitótico e a imunorreatividade com Ki-67 parecem ser muito úteis para distinção de tumores malignos de benignos (GROSS et al., 2005; BABA et al., 2007) e para estabelecer um prognóstico e plano terapêutico (RAMOS-VARA et al., 2000 e SMEDLEY et al., 2011). O antígeno Ki-67 (MIB-1) é o principal marcador das células em proliferação (FOURNEL-FLEURY et al., 1997; KIUPEL et al., 1999; SUZANO et al., 2008). O anticorpo Ki-67 (MIB 1) não constava no painel de rotina utilizado no Setor de Anatomia Patológica e o referido trabalho foi importante para a padronização do protocolo e uso deste no auxílio do prognóstico das diversas neoplasias.

CONCLUSÕES

Há correlação entre a imunorreatividade ao Ki-67 e a quantidade de mitoses por 10 campos independente da localização e classificação histológica dos melanomas.

A fração de crescimento tumoral determinada pelo Ki-67 varia significativamente entre tumores melanocíticos localizados na cavidade oral, pele e em leito ungueal.

Na variante benigna, o índice proliferativo é menor quando comparado com as neoplasias malignas.

Um único método de contagem pode ser efetivo para todos os tipos de neoplasias melanocíticas independente da sua localização e/ou classificação.

INFORME VERBAL

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Não temos conflito de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, A. C.; SPITZ, S. Malignant melanoma. A clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. **Cancer**, v. 6, n. 1, p. 1-45, 1953.
- BABA, A. I; CĂTOI, C. **Comparative oncology**. Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. 2014.
- BERGIN, I. L. et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 41-53, 2011.
- BERGMAN, P. J. et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1284-1290, 2003.
- BERGMAN, P. J. et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4582-4585, 2006.
- BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007.
- BOLON, B.; MAYS, MB CALDERWOOD; HALL, B. J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. **Veterinary pathology**, v. 27, n. 2, p. 96-102, 1990.
- BRITO, M. F. et al. Metastasizing oral melanoma in a cow. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1236-1240, 2009.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, v. 17, n. 6, p. 489-503, 1990.
- COWELL, R. L, VALENCIANO, A. C. **Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat** (4th ed.). Missouri, USA: Elsevier. p. 32-34, 2014.
- ELIAS, J. M. Immunohistochemical methods. In: Elias JM, editor. **Immunohistopathology. A Practical Approach to Diagnosis**. 2nd ed Chicago, IL: ASCP Press. p. 1-110, 2003.
- ELSTON, E. W.; ELLIS, I. O. Method for grading breast cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 46, n. 2, p. 189, 1993.
- ESPLIN, D. G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 6, p. 889-896, 2008.

FERREIRA, C. M. M; MACIEIRA, J. M. P.; COELHO, J. M. C. O. Análise imunohistopatológica, clínica e evolutiva dos melanomas. **An Bras Dermatol**, v. 72, n. 2, p. 117-26, 1997.

FOURNEL-FLEURY, C. et al. Growth fractions in canine non-Hodgkin's lymphomas as determined in situ by the expression of the Ki-67 antigen. **Journal of comparative pathology**, v. 117, n. 1, p. 61-72, 1997.

GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. **European journal of cancer**, v. 46, n. 2, p. 270-283, 2010.

GERDES, J. et al. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. **The Journal of pathology**, v. 168, n. 1, p. 85-86, 1992.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2014.

GROSS, T. L. et al. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. John Wiley & Sons, 2005.

HAHN, K. A. et al. Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 251-256, 1994.

HERNANDEZ, B. et al. Naturally occurring canine melanoma as a predictive comparative oncology model for human mucosal and other triple wild-type melanomas. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 2018.

IDIKIO, H. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 3, n. 2, p. 169, 2009.

KAUSCH, I. et al. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **International journal of cancer**, v. 105, n. 5, p. 710-716, 2003.

KEY, G. et al. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections. **Journal of clinical pathology**, v. 46, n. 12, p. 1080-1084, 1993.

KIUEPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 292-300, 1999.

KIRKNESS, E. F. et al. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v. 301, n. 5641, p. 1898-1903, 2003.

LANDMAN, M. L. L. **Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

LAPRIE, C. et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary dermatology**, v. 12, n. 3, p. 139-147, 2001.

MATOS, L. L. et al. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. **Biomarker insights**, v. 5, p. BMI. S2185, 2010.

MEUTEN, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. John Wiley & Sons, 2016.

MILLANTA, F. et al. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. **Research in veterinary science**, v. 73, n. 1, p. 45-51, 2002.

MOULTON, J. Tumors in domestic animals (5th ed.). Iowa, USA: Wiley Blackwell. p. 88-141, 2017.

NISHIYA, A. T. et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

OHSIE, S. J. et al. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of cutaneous pathology**, v. 35, n. 5, p. 433-444, 2008.

PALANIVELU, M. et al. Multiple cutaneous melanomas in a dog: A case report. **Adv. Anim. Vet. Sci**, v. 1, n. 4, p. 127-128, 2013.

PINHO, S. S. et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. **Translational Research**, v. 159, n. 3, p. 165-172, 2012.

PROUTEAU, A; ANDRÉ, C. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 501, 2019.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary pathology**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

RIEGER, E. et al. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of cutaneous pathology**, v. 20, n. 3, p. 229-236, 1993.

ROELS, S; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. **Journal of comparative pathology**, v. 121, n. 1, p. 13-24, 1999.

SCHULTHEISS, P. C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 18, n. 4, p. 422-425, 2006.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. **Oral oncology**, v. 36, n. 5, p. 404-413, 2000.

SEVASTRE, B. et al. Immunohistochemical Identification of Canine Melanocyte Neoplasms and Prognostic Evaluation of Ki67 Expression. **Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine**, v. 69, 2012.

SILVA, K. L. F. **Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos**. 2013. Dissertação de Mestrado.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002.

SPANGLER, W. L.; KASS, Philip H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 136-149, 2006.

SPYRATOS, F. et al. Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value. **Cancer**, v. 94, n. 8, p. 2151-2159, 2002.

SOYER, H. P.; SMOLLE, J.; KERL, H. Ki 67 Immunostaining in Melanocytic Skin Tumors: Correlation with Histologic Parameters and Prognostic Significance. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 13, n. 2, p. 196, 1991.

SUZANO, S.M.C. et al. Proliferação celular nos linfomas caninos. *Braz. J. Veterinary Research*, v. 45, n. 4, p. 313-319, 2008.

TEIXEIRA, T. F. et al. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. **Brazil Journal Veterinary Pathology**, v. 3, n. 2, p. 100-104, 2010.

VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer investigation**, v. 18, n. 8, p. 781-792, 2000.

VEENA, P. et al. Malignant melanoma in a Dog-A Case report. **Veterinary World**, v. 5, p. 431, 2012.

WEISS, S. A. et al. Revisiting determinants of prognosis in cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 121, n. 23, p. 4108-4123, 2015.

WILLIAMS, M. D. Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: mucosal melanomas. **Head and neck pathology**, v. 11, n. 1, p. 110-117, 2017.

WITHROW, S. J.; VAIL D. M. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Withrow & McEwen's **Small Animal Clinical Oncology**. 4a ed. Saunders. United States, p. 375-401, 2007.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. (Eds.) Withrow and MacEwen's **Small Animal Clinical Oncology**, 5th ed. Elsevier: St. Louis, MO, USA, ISBN 978-1-4377-2362-5. 2013.

YANG, W. et al. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki-67 (MIB-1) antibodies. **Human pathology**, v. 27, n. 1, p. 70-76, 1996.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (GERAIS)

- BABA, A. I.; CÂTOI, C. Tumors of the alimentary system. In: BABA, A. I.; CÂTOI, C. (Ed.). **Comparative oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, p. 1-787, 2007.
- BENITES, N. R.; MEVILLE, P. A. Tratamento homeopático de melanoma maligno em cadela. **Cultura homeopática**, p. 68-70, 2003.
- BERGMAN, P. J. et al. Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 1284-1290, 2003.
- BERGMAN, Philip J. Canine oral melanoma. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007.
- BERGMAN, P. J.; KENT, M. S.; FARESE, J. P. Melanoma. In D. Vail (Ed.). **Small Animal Oncology**, 5a Ed, St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, p. 321-334, 2012.
- BERGIN, I.L., SMEDLEY, R.C., ESPLIN, D.G., SPANGLER, W.L. & KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki-67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**. v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.
- BOSTON, S. E. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 4, p. 401-407, 2014.
- BROCKLEY, L. K.; COOPER, M. A.; BENNETT, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zealand veterinary journal**, v. 61, n. 1, p. 25-31, 2013.
- BROWN, C. C.; BAKER D. C.; BARKER, I. K. Alimentary System. In: MAXIE, G. (Ed.) **Pathology of Domestic Animals**. 5. ed. v. 1. Cap. 1, p. 1-296. Philadelphia: Elsevier, 2007.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception?. **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.
- CAMARGO, L. P; CONCEIÇÃO, L. G; DOS SANTOS COSTA, P. R. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 138-152, 2008.
- CARVALHO, S. L. M. **Trabalho De Conclusão do Curso Medicina Veterinária**. 2005. Disponível em: <<http://www.upis.br/pesquisas/pdf/veterinaria/Silvia%20Luanna%20Mendes%20Carvalho.pdf>>. Acesso em: 31, agosto, 2020.

CHANDRASHEKARAIHAH, G. B. et al. Canine squamous cell carcinoma: a review of 17 cases. **Braz J Vet Pathol**, v. 4, n. 2, p. 79-86, 2011.

CLARKE, L. L.; RISSI, D. R. Malignant rectal melanoma in 2 dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 2, p. 152, 2018.

COLMENARES-ROLDÁN, L. M; LOPERA, M. M. V; SUAZA, G. A. V. Melanoma lentiginoso acral: una variante de melanoma maligno de especial interés en Colombia. **Iatreia**, v. 21, n. 4, p. ág. 386-397, 2008.

CONCEIÇÃO, L. G.; LOURES, F.H. Sistema tegumentar. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Roca, p. 407- 486, 2016.

COYLE, V. J.; GARRETT, L. D. Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs. **Veterinary Medicine**, 2009.

DE AGUIAR, A. F.; KOWALSKI, JR., L. P.; DE ALMEIDA, O. P. (2007). Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral Oncology**. v. 43, n. 6, p. 593-601. 2007.

DERVISIS, N. G. Introduction of veterinary oncology and diagnostic approach to the cancer patient. Proceedings. **The 15th Congress of FAVA**, 27-30 October, Bangkok, Thailand. p. 71- 74. 2008.

DUCHROW, M. et al. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. **Cell proliferation**, v. 29, n. 1, p. 1-12, 1996.

FIGUEIREDO, Licia Caldas et al. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.

GARMA-AVIÑA, A.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. Cutaneous melanomas in domestic animals. **Journal of cutaneous pathology**, v. 8, n. 1, p. 3-24, 1981.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2013.

GINN, P. E.; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Skin and Appendages. In: MAXIE, G. (Ed.) **Pathology of Domestic Animals**. 5. ed.. Philadelphia: Elsevier, v. 2. Cap. 5, p. 553-782, 2007.

GOLDSCHMIDT, M.H. Pigmented lesions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v.12, p. 507-514, 1994.

GOLDSCHMIDT, M. H. Tumors of the skin and soft tissues. **Tumors in domestic animals**, p. 45-117, 2002.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. **Tumors in domestic animals**, v. 5, p. 97e99, 2017.

GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. H. Neoplasias Cutâneas. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. de. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 339-36, 2016.

HAHN, K. A. et al. Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 251-256, 1994.

HARGIS, A. M.; GINN, P. E. O Tegumento. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed) **Bases da Patologia em Veterinária. Brasil: ELSEVIER**, 2013

HAUCK, M. L. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Withrow, S. J.; Vail, D. M., Page, R. L. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed., Saint Louis: Saunders Elsevier, cap. 18, p. 389-393, 2013.

HENRY, C. J.; HIGGINBOTHAM, M. L. Cancer management in **Small Animal Practice**. Missouri, USA: Saunders. p. 136- 145, 2010.

IDIKIO, H. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 3, n. 2, p. 169, 2009.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. A pele e seus apêndices. **Patologia Veterinária. São Paulo: Manole**, p. 831-886, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e Anexos. In: **Histologia Básica**. 12. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 18, p. 353-365, 2013.

KUBBUTAT, M. H. et al. Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). **Journal of clinical pathology**, v. 47, n. 6, p. 524-528, 1994.

LAPRIE, C., et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behavior in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**. v. 12, p. 139, 2001.

LAVIER, T. et al. Post-surgical outcome and prognostic factors in canine malignant melanomas of the haired skin: 87 cases (2003–2015). **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 9, p. 981, 2018.

LIPTAK, J. M.; WITHROW, S. J. Cancer of the Gastrointestinal Tract. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Ed.). **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 5th ed. St. Louis: Elsevier - Saunders. p. 381–431, 2012.

MANZAN, R. M. et al. Considerações sobre Melanoma Maligno em cães: uma abordagem histológica. **Boletim de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 1, 2005.

MCENTEE, M. C. **Veterinary radiation therapy**: review and current state of the art. Oral and maxillofacial surgery in dogs and cats. Pennsylvania: Elsevier p. 387-402. 2012.

MEUTEN, Donald J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. John Wiley & Sons, 2016.

MODIANO, J.F.; RITT, M.G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: Pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 163-174, 1999.

MUKARATIRWA, S. Prognostic and predictive markers in canine tumours: rationale and relevance. A review. **Veterinary quarterly**, v. 27, n. 2, p. 52-64, 2005.

MURPHY, S. et al. Oral malignant melanoma—the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. **Veterinary and comparative oncology**, v. 3, n. 4, p. 222-229, 2005.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Distúrbios da cavidade bucal, da faringe e do esôfago. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, c.31, p. 322 – 331, 2001.

NISHIYA, A. T. et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

NORTHRUP, N. et al. Tumors of the skin, subcutis and other soft tissues. **Cancer management in small animal practice**, p. 299-332, 2010.

OHSIE, S. J et al. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 35, p. 433-444, 2008.

ORDÓÑEZ, N. G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: a review and update. **Human pathology**, v. 45, n. 2, p. 191-205, 2014.

OTTNOD, J. M. et al. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 3, p. 219-229, 2013.

OWEN, Laurence Nightingale. TNM classification of tumors in domestic animals. **Clinical Veterinary Oncology**, 1980.

PIPPI, N.L.; GOMES, C. Neoplasias da cavidade oral. In: DALECK, C.R.; DE NARDI, A.B. **Oncologia em cães e gatos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca, cap. 28, p. 385-394, 2016.

PROULX, D. R et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Veterinary Radiology Ultrasound**. v.44, n.3, p.352- 359, 2003.

PRZEŹDZIECKI, R.; CZOPOWICZ, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 44, n. 4, p. 597, 2015.

RAMOS-VARA, J. A et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RAMOS-VARA, José A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 393-413, 2008.

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 443-450, 2011.

RAMOS-VARA, José A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Drug Safety Evaluation**, p. 115-128, 2017.

ROELS, S; TILMANT, K; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs. **Journal of comparative pathology**, v. 121, n. 1, p. 13-24, 1999.

ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340-346, 2012.

SABATTINI, S. et al. Evaluation of Ki-67 expression in feline non-ocular melanocytic tumours. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2018.

SCOTT, D.W., MILLER, JR., W.H., GRIFFIN, C.E. Neoplastic and non-neoplastic tumors. In Muller & Kirk's **Small animal dermatology**. 6 Ed. P. 1236, Philadelphia: Saunders, 2001.

SEGAOULA, Z. et al. Isolation and characterization of two 11 canine melanoma cell lines: new models for comparative oncology. **BMC Cancer**, v.18, n.1, 1219, 2018.

SILVA, K.L.F. **Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos**. [s.l.] Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2013.

SMEDLEY, R.C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 54-72, 2011.

SMITH, S.H.; GOLDSCHMIDT M.H.; MCMANUS P.M. A Comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 651-678, 2002.

SOUZA, F. B. et al. Melanoma em cavidade oral de um canídeo - Relato de Caso. 2011. Disponível em: http://fio.edu.br/cic/anais/2011_x_cic/PDF/Medicinaveterinaria/MELANOMA%20EM%20CAVIDADE%20ORAL.pdf >. Acesso em: 07, outubro, 2019.

SULAIMON, S.S.; KITCHELL, B.E.; EHRHART E.J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 127, p. 162-168, 2002.

TEIXEIRA, T. F. et al. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 2, p. 100-104, 2010.

TEIXEIRA, T. F. **Melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

THÉON, A. P. et al. Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with periodontal tumors treated with megavoltage irradiation. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 210, n. 6, p. 785–788, 1997.

TUOHY, J. L. et al. A review of sentinel lymph node evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 2, p. 81–91, 2009.

VAIL, D.M., WITHROW, S.J. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow and MacEwen's. **Small Animal Clinical Oncology**, ed.4, p. 375. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007.

VERSTRAETE F. J. M. Mandibulectomy and Maxilectomy. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 35, p. 1009, 2005.

WITHROW, S; VAIL, D; PAGE, R. **Small Animal Oncology.** (D. Vail, Ed.) (5a Edição). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2012.