

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

TESE

**CARACTERIZAÇÃO DAS IMUNOSSUPRESSÕES LOCAL E
SISTÊMICA EM CÃES COM NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS**

Nathalia da Silva Carvaho

2025



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

**CARACTERIZAÇÃO DAS IMUNOSSUPRESSÕES LOCAL E
SISTÊMICA EM CÃES COM NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS**

NATHÁLIA DA SILVA CARVALHO

Sob orientação da professora
Vivian de Assunção Nogueira Carvalho

E co-orientação da Doutora
Samay Zillmann Rocha Costa

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

Seropédica, RJ
Setembro de 2025

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

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

C 331c Carvalho, Nathalia da Silva, 1995-
Caracterização das imunossupressões local e
sistêmica em cães com neoplasias melanocíticas. /
Nathalia da Silva Carvalho. - Rio de Janeiro, 2025.
53 f.: il.

Orientadora: Vivian de Assunção Nogueira Carvalho.
Coorientadora: Samay Zillmann Rocha Costa.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Medicina
Veterinária, 2025.

1. imunomodulação. 2. fração de crescimento. 3.
macrófagos. 4. melanoma. I. Carvalho, Vivian de
Assunção Nogueira, 1980-, orient. II. Costa, Samay
Zillmann Rocha, 1988-, 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
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

NATHALIA DA SILVA CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM: 26/09/2025

Vivian de Assuncao Nogueira Carvalho (UFRRJ)
(Orientadora)

Samay Zillmann Rocha Costa (IFFar)
(Co -orientadora)

Tiago da Cunha Peixoto (UFBA)

Mriana Coreia Oliveira (UNESA)

Paula Velozo Leal (UFBA)

Cristiane Divan Baldani (UFRRJ)



ATA DE DEFESA DE TESE Nº 188/2025 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 02/10/2025 16:37)

CRISTIANE DIVAN BALDANI
PROFESSOR DO MAGISTERIO
SUPERIOR
DeptMCV (12.28.01.00.00.00.53)
Matrícula: ###724#0

**(Assinado digitalmente em 02/10/2025
17:51)**

VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA
CARVALHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO
SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: ###061#5

(Assinado digitalmente em 03/10/2025 00:09)

TIAGO DA CUNHA PEIXOTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.277-##

**(Assinado digitalmente em 20/10/2025
17:23)**

PAULA VELOZO LEAL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.401-##

(Assinado digitalmente em 13/10/2025 16:38)

MARIANA CORREIA OLIVEIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.567-##

**(Assinado digitalmente em 13/10/2025
11:13)**

NATHALIA DA SILVA
CARVALHO
DISCENTE
Matrícula: 2021#####5

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **188**, ano: **2025**, tipo: **ATA DE DEFESA DE TESE**, data de emissão: **02/10/2025** e o código de verificação: **8f818ff223**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que sob muito sol, me fizeram chegar até aqui, pela sombra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por guiar com sabedoria meu caminho até aqui e por toda a proteção.

Aos meus pais, pois, sem eles nada seria possível. Obrigada por todo incentivo e por toda a dedicação, por nunca medirem esforços para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Jamais encontraria palavras suficientes para agradecer. Vocês são a razão de tudo. Essa conquista é nossa! Amo vocês com toda força do mundo! À minha irmã por ser um exemplo 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 toda equipe do Setor de Anatomia Patológica da UFRRJ, em especial a Paula Retamero, Asheley Henrique, Karla Nascimento, Fernanda Freitas, Isabel Reina, Marina Cunha, Adriano Sales, Fernanda Rocha, Miguel Hernandez (*in memoriam*), Davi Leal e Raquel Rangel. Vocês tornaram meus dias - e todo esse processo - muito mais fáceis. Obrigada pela troca, por toda a ajuda, pelas conversas e momentos incríveis vividos. Nós seremos, para sempre, a família SAP. Amo vocês!

À todos os meus grandes amigos e amigas que conquistei ao longo da vida, que sempre acreditaram e torceram por mim: vocês nem imaginam o quanto foram importantes nessa fase. Saibam que cada palavra e cada gesto de incentivo, me fizeram chegar até aqui. Obrigada por tudo, sempre.

Aos meus amigos do Hospital Municipal Veterinário Jorge Vaitsman, Andrey Fernandes e João Marcos Barbosa, muito obrigada pela oportunidade e por todo conhecimento compartilhado. É um prazer imenso dividir a rotina com vocês. Aos demais profissionais com os quais compartilho o dia a dia de trabalho, agradeço por toda troca e pelos conhecimentos adquiridos.

Ao meu namorado, Fábio Lopes, obrigada por tanto! Você esteve presente em muitas etapas desse processo na minha vida e foi um suporte fundamental para essa conquista. Sou eternamente grata por tudo.

À todos os professores que participaram da minha formação técnico-científica e também, humana: se cheguei longe, foi porque vocês me ajudaram a trilhar esse caminho. Em especial, à minha orientadora, Vivian Nogueira, que me acompanha desde a iniciação científica, sempre me dando oportunidades na patologia animal. O meu sincero muito obrigada! Você é exemplo de pessoa e de profissional. Agradeço também à minha coorientadora, Samay Zillmann, que sempre foi uma fonte de inspiração, e que esteve presente com todo o suporte necessário.

Por fim - e não menos importante -, a todos os animais que já passaram pela minha vida e aos que ainda estão, eles são a grande motivação para que eu busque ser uma profissional melhor a cada dia. É tudo por vocês!

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

RESUMO

CARVALHO, Nathália da Silva. **Caracterização das imunossupressões local e sistêmica em cães com neoplasias melanocíticas**. p.58. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Os mecanismos de evasão tumoral têm sido o cerne de inúmeras pesquisas no intuito de se encontrar novos alvos para terapias imunológicas. Melanomas são neoplasias imunogênicas e a observação da regressão parcial ou completa associada à marcada infiltração por linfócitos T contribuem com esta afirmativa, entretanto, esse tipo de neoplasia também apresenta diversos mecanismos de evasão tumoral. Além disso, os componentes do microambiente tumoral influenciam de forma positiva ou negativa no desenvolvimento da neoplasia. A polarização de macrófagos M2 no infiltrado inflamatório tem ação pró-tumorigênica, pois secretam citocinas com ação anti-inflamatória que estimulam a neovascularização local. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as imunossupressões local e sistêmica em cães diagnosticados com neoplasia melanocítica no Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (SAP/UFRRJ). Foram realizadas análises imuno-histoquímicas para pesquisar a contagem de subpopulações de macrófagos M2 com o uso do anticorpo anti-CD-206, que possam estar infiltrados na neoplasia, nos linfonodos regionais e, quando provenientes de necropsia, nos demais órgãos (baço, pulmão, encéfalo), além da fração de crescimento celular ou índice de Ki-67. Foram utilizados blocos de parafina do arquivo SAP com fragmentos de neoplasias melanocíticas em cães (orais e cutâneas) e os respectivos linfonodos regionais. Para pesquisa em órgãos internos, foram priorizadas necropsias de cães previamente diagnosticados e doados para estudo com termo de consentimento. Foram coletados dados referentes a 25 neoplasias melanocíticas em cães, sendo quatro melanocitomas e, os demais, melanomas. Com relação à epidemiologia, 9 acometeram fêmeas, 16 machos e todos os animais eram adultos entre sete e 17 anos de idade. Treze casos estavam localizados na pele e 11 na cavidade oral, havia um caso sem identificação do sítio de origem. Entre os melanomas, 19 eram do tipo misto, quatro epitelioides e dois fusiformes. Em 19 dos 25 casos, o pleomorfismo apresentou-se moderado a acentuado e, em 15 casos, foram observadas mais de 10 figuras de mitose em 10 campos de maior aumento (Obj. 40x, 2,37 mm²). A imuno-histoquímica com o anticorpo Ki-67 apresentou imunorreatividade em 20 casos, todos da variante maligna. Em 13 casos foi observada fração de crescimento elevada. Sete destes, com origem cutânea e os outros 6, na cavidade oral. A expressão de CD206 foi observada em 21 casos, com distribuição intratumoral e peritumoral. Destes, 14 com origem cutânea e outros 7, na cavidade oral. Desta maneira, pôde-se demonstrar indícios de alterações e ajustes locais e/ou sistêmicos em cães com neoplasias melanocíticas e estabelecer novos marcadores de prognóstico, como o CD206, de maneira a complementar e tornar mais preciso o prognóstico dessas neoplasias em cães, além de subsidiar pesquisas neste campo em humanos.

Palavras-chave: imunomodulação, fração de crescimento, macrófagos, melanoma

ABSTRACT

CARVALHO, Nathália da Silva. **Characterization of local and systemic immunosuppression in dogs with melanocytic neoplasms.** p.58. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary Medicine, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Tumor evasion mechanisms have been the focus of numerous studies aimed at finding new targets for immunological therapies. Melanomas are immunogenic neoplasms, and the observation of partial or complete regression associated with marked T lymphocyte infiltration supports this assertion. However, this type of neoplasm also exhibits several tumor evasion mechanisms. Furthermore, components of the tumor microenvironment positively or negatively influence neoplasm development. The polarization of M2 macrophages in the inflammatory infiltrate has a pro-tumorigenic effect, as they secrete cytokines with anti-inflammatory action that stimulate local neovascularization. The objective of this study was to characterize local and systemic immunosuppression in dogs diagnosed with melanocytic neoplasia in the Pathological Anatomy Department of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (SAP/UFRRJ). Immunohistochemical analyses were performed to determine the number of M2 macrophage subpopulations using anti-CD-206 antibody. These subpopulations may be infiltrated in the neoplasia, regional lymph nodes, and, when obtained at necropsy, other organs (spleen, lung, brain), in addition to the cell growth fraction or Ki-67 index. Paraffin blocks from the SAP archive were used to study fragments of melanocytic neoplasms in dogs (oral and cutaneous) and their respective regional lymph nodes. For internal organ research, necropsies of previously diagnosed dogs donated for study with informed consent were prioritized. Data were collected on 25 melanocytic neoplasms in dogs, four melanocytomas and the others melanomas. Regarding epidemiology, nine affected females, 16 males, and all animals were adults between seven and 17 years of age. Thirteen cases were located in the skin and 11 in the oral cavity, there was a case without identification of the site of origin. Among the melanomas, 19 were mixed, four epithelioid, and two spindle-shaped. In 19 of the 25 cases, pleomorphism was moderate to severe, and in 15 cases, more than ten mitotic figures were observed in ten high-power fields (Obj. 40x, 2,37 mm²). Immunohistochemistry with the Ki-67 antibody showed immunoreactivity in 20 cases, all of the malignant variant. A high growth fraction was observed in 13 cases. Seven of these originated in the skin and the other six in the oral cavity. CD206 expression was observed in 21 cases, with intratumoral and peritumoral distribution. Of these, 14 originated in the skin and the other seven in the oral cavity. Thus, it was possible to demonstrate evidence of local and/or systemic alterations and adjustments in dogs with melanocytic neoplasms and establish new prognostic markers, such as CD206, to complement and improve the prognosis of these neoplasms in dogs, as well as to support research in this field in humans.

Keywords: immunomodulation, growth fraction, macrophages, melanoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos macroscópicos de melanomas diagnosticados em cães no SAP/UFRRJ: **A-** Nódulo por vezes enegrecido e irregular em cavidade oral de cão, Poodle, diagnosticado com melanoma pigmentado **B-** Metástase de melanoma pigmentado no linfonodo submandibular de cão. **C-** Nódulo focal, ligeiramente elevado, parcialmente delimitado, amarelo com áreas pretas multifocais no lobo caudal esquerdo. Inset: superfície de corte de nódulo pulmonar. **D-** Nódulo focal firme, preto e parcialmente delimitado, expandindo as substâncias telencefálicas cinzenta e branca (cérebro fixado em formol). **E-** Metástase de melanoma pigmentado. Nódulo com 3,0 cm de diâmetro localizado no baço. **F-** Metástase pulmonar de melanoma pigmentado. Observam-se nos lobos pulmonares, nódulos enegrecidos multifocais a coalescentes. Com tamanhos de 0,5 cm a 5,0 cm. **Arquivo SAP/UFRRJ.**

Figura 2: Aspectos microscópicos de melanoma em canino: **A-** Melanoma epitelióide não pigmentado, pobremente diferenciado. Pele. Obj.40x. **B-** Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj.20x. **C-** Melanoma epitelióide parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Pele. Obj.40x. **D-** Melanoma epitelióide parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado com atividade juncional. Pele. Obj.40x. **E-** Melanocitoma. Pele. Obj. 10x.. **Fonte: SAP/UFRRJ. Coloração de hematoxilina e eosina.**

Figura 3: Imunorreatividade aos anticorpos Ki-67 e CD206 nas neoplasias melanocíticas. **A-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 40x. **B-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 20x. **C-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 20x. Observa-se núcleos celulares imunorreativos corados pelo cromógeno magenta. **D-** Imunorreatividade ao anticorpo CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj 20x. **E-** Imunorreatividade ao anticorpo CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj. 40x. **F-** Imunorreatividade ao anticorpo CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj 20x. Observam-se citoplasmas de macrófagos corados pelo cromógeno, entremeando a neoplasia. **Fonte: SAP/UFRRJ. Cromógeno magenta. Contracoloração com hematoxilina.**

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Localização das neoplasias melanocíticas observadas no estudo.
- Gráfico 2:** Localização das neoplasias melanocíticas (nódulo primário e linfonodos).
- Gráfico 3:** Ki-67 na Cavidade Oral e na Pele.
- Gráfico 4:** Ki-67 e a relação com o diagnóstico.
- Gráfico 5:** Associação de mitose e fração de crescimento celular.
- Gráfico 6:** Ki-67 e a relação com inflamação e necrose.
- Gráfico 7:** Ki-67 na pele e a presença de úlcera.
- Gráfico 8:** Ki-67 e a presença de necrose nos casos da Cavidade Oral.
- Gráfico 9:** Ki-67 por caso.
- Gráfico 10:** Ki-67 na Cavidade Oral (nódulo primário e respectivos linfonodos).
- Gráfico 11:** Ki-67 nos nódulos e linfonodos (Pele).
- Gráfico 12:** CD206 e a localização.
- Gráfico 13:** Imunorreatividade ao CD206 nos sítios primários (pele e cavidade oral) e nos linfonodos.
- Gráfico 14:** Relação entre a imunorreatividade do CD206 e a fração de crescimento celular na cavidade oral.
- Gráfico 15:** Relação entre a imunorreatividade do CD206 e a fração de crescimento celular na pele.
- Gráfico 16:** CD206 e a presença de necrose.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados.

Tabela 2: Imunorreatividade das neoplasias melanocíticas ao Ki-67 e ao CD206.

LISTA DE ABREVIACÕES

FN: field number

IHC: imuno-histoquímica

LS: linfonodo sentinela

PBS: tampão fosfato-salino

SAP: Setor de Anatomia Patológica

SRD: sem raça definida

TAMs: macrófagos associados a tumores

UFBA: Universidade Federal da Bahia

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

OBJ: objetiva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Neoplasias Melanocíticas	12
2.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos	12
2.3 Diagnóstico e diagnósticos diferenciais	13
2.4 Histopatologia	14
2.5 Imunogenicidade	15
2.6 Imuno-histoquímica.....	16
2.7 Macrófagos associados a tumores (TAMs).....	17
2.8 Proteína Ki-67	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Local.....	19
3.2 Amostras	19
3.3 Histopatologia	19
3.4 Imuno-histoquímica.....	19
3.5 Análises	21
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

Melanomas são neoplasias fortemente imunogênicas e seus mecanismos de evasão tumoral têm sido alvos de diversas pesquisas. A síntese e secreção de citocinas imunossupressoras, como interleucinas e os processos de imunomediação, são exemplos de diversos mecanismos utilizados pelas células neoplásicas para escapar ou diminuir a resposta imunológica do organismo (MUKHERJI, 2013). O microambiente tumoral também pode contribuir para o desenvolvimento da neoplasia. A polarização de macrófagos M2, infiltrados na neoplasia, favorece a secreção de citocinas anti-inflamatórias, resultando em função pró-tumorigênica (QUAIL; JOYCE, 2013).

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). Por isso, o Ki-67 torna-se um bom marcador do crescimento celular e com isso, um fator prognóstico importante.

Tanto a imunidade inata, quanto a adaptativa são necessárias para a prevenção do desenvolvimento neoplásico (VESELY et al., 2011) e uma falha na vigilância imunológica pode permitir o aparecimento e desenvolvimento de neoplasias (ATHERTON et al., 2016). A compreensão destes mecanismos é de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias imunológicas.

Este estudo teve como objetivo principal investigar a infiltração por macrófagos M2 e o índice de Ki-67 em neoplasias melanocíticas caninas, linfonodos regionais e órgãos internos e, com isso, caracterizar um padrão de imunossupressão que possa servir como novos marcadores de prognóstico para essa espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias Melanocíticas

As neoplasias melanocíticas originam-se dos melanócitos, células produtoras de melanina localizadas principalmente na camada basal da epiderme, na junção dermoepidérmica, nos folículos pilosos, nas leptomeninges e na úvea (BILLINGS, S. D, 2018).

Tumores melanocíticos são descritos na espécie humana e em animais domésticos e não domésticos (VAN DER WEYDEN et al., 2020). Embora discutível, em cães e humanos, o termo melanocitoma é usado para se referir a neoplasias com aumentos significativos em celularidade e/ou pigmentação intensa e baixa probabilidade de progressão e o melanoma é usado para lesões malignas (ELDER et al., 2018; GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020).

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).

Embora não haja consenso quanto à etiologia do melanoma cutâneo canino (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2019), alguns fatores preditivos incluem consanguinidade, exposição química, inflamação e suscetibilidade hormonal e genética (NISHIYA et al., 2016).

O trauma contínuo pode estimular o reparo celular, possibilitando maior ocorrência de mutações e o desenvolvimento da neoplasia (HARGIS; GINN, 2013).

2.2 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Os melanocitomas representam 3% a 4% das neoplasias cutâneas em cães (GROSS et al., 2008), e a incidência é maior entre as idades de 7 e 12 anos. O local de predileção é a cabeça, especialmente as pálpebras (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020).

Melanocitomas podem variar de pequenos nódulos a massas maiores e geralmente apresentam coloração enegrecida devido à abundância de melanina (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020). Seu prognóstico é bom, dado seu comportamento benigno (GRANDI, F; RONDELLI, M. C. H, 2016). Não há consenso sobre a possibilidade de transformação maligna. Enquanto alguns autores o referem como um evento raro (SMITH et al., 2002), outros recomendam considerar a possibilidade de diferenciação em melanoma (GRANDI, F; RONDELLI, M. C. H, 2016). 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 5,0 cm de diâmetro, geralmente pigmentados, de coloração preta ou amarronzada (CONCEIÇÃO; LOURES, 2016).

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). Os melanomas representam 7% de todos os tumores malignos caninos (SMITH et al., 2002) com pico de incidência entre os 10 e os 13 anos de idade. Os locais anatômicos mais frequentes variam entre os estudos; no entanto, cavidade oral e pele pilosa são os mais comuns (SPANGLER, W. L.; KASS, P. H, 2006; NISHIYA et al., 2016), especialmente a pele da cabeça e do escroto (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020). 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, 2020).

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).

Os melanomas apresentam formas e tamanhos variáveis, incluindo padrões verrucosos, pedunculados, nodulares ou em placas (GRANDI, F; RONDELLI, M. C. H, 2016). A pigmentação também é variável e pode estar ausente em lesões malignas (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020). Ulceração é comum em lesões mais extensas (GROSS et al., 2008). Em geral, esses tumores são tipicamente pretos, quando pigmentados, ou aparecem como lesões esbranquiçadas na ausência de produção de melanina. Podem exibir um padrão de crescimento exofítico ou se manifestar como nódulos sésseis, independentemente de seu local de origem (SMEDLEY et al, 2022). O tamanho dos tumores melanocíticos pode variar de menos de um centímetro, observado principalmente em melanocitomas, a vários centímetros na contraparte maligna, que frequentemente parece multilobulada e ulcerada (KIM et al., 2021; SMEDLEY et al, 2022).

2.3 Diagnóstico e diagnósticos diferenciais

A maioria das neoplasias melanocíticas é facilmente diagnosticada por citologia ou histopatologia (PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015). 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 não pigmentados (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 imuno-histoquímica usando marcadores como Melan-A que é uma linhagem específica de marcador de melanócito (RAMOS-VARA; MILLER, 2011).

Mukaratirwa et al., (2005) e Smedley et al., (2022) 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.

Se o diagnóstico não puder ser estabelecido no exame microscópico de rotina, a imuno-histoquímica para os marcadores específicos de melanócitos Melan-A, PNL-2, proteína reativa à tirosina (TRP)-1 e TRP-2 é a mais comumente utilizada para confirmar a diferenciação melanocítica (BERGMAN, 2007; TSOI et al., 2021; SMEDLEY et al., 2022). Um coquetel diagnóstico melanocítico contendo anticorpos contra Melan-A, PNL-2, TRP-1 e TRP-2 demonstrou melhorar a sensibilidade geral para 93,9% na diferenciação de sarcomas de tecidos moles, mantendo 100% de especificidade, e representa o padrão ouro atual para o diagnóstico de neoplasias melanocíticas não pigmentadas em cães (TSOI et al., 2021; SMEDLEY et al., 2022).

Os melanomas não pigmentados podem mimetizar outras neoplasias, como carcinomas anaplásicos, tumores neuroendócrinos, sarcomas fusiformes, principalmente fibrossarcoma, hemangiopericitoma, 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 (PIPII; GOMES, 2016).

2.4 Histopatologia

Microscopicamente, há uma grande variação quanto aos subtipos celulares, sendo classificados 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 (ROLIM et al., 2012; PRZEŹDZIECKI et al., 2015).

Histologicamente, os melanócitos neoplásicos bem diferenciados apresentam-se como células redondas ou poligonais a fusiformes, com quantidades variáveis de citoplasma eosinofílico que contém quantidades variáveis de grânulos de melanina marrom. Diferentes morfologias celulares foram relatadas, sendo as mais comuns epitelióide/poligonal, fusiforme/fibromatosa e epitelióide e fusiforme mistas (MUNDAY; KIUPEL; LOEHR, 2017; SMEDLEY et al., 2022). Múltiplas morfologias celulares e arranjos de células neoplásicas, como pacotes, lâminas e feixes, estão frequentemente presentes na mesma neoplasia (MUNDAY; KIUPEL; LOEHR, 2017; SMEDLEY et al., 2022). Os núcleos das células neoplásicas são redondos a ovais, finamente pontilhados a vesiculados, exibem anisocariose mínima a leve e geralmente contém um único nucléolo proeminente com orientação central, criando uma aparência de “olho de coruja” (SMITH et al., 2002; SMEDLEY et al., 2022).

Uma importante característica diagnóstica é a presença de células neoplásicas na junção estroma subepitelial-epitelial. Embora a atividade juncional e o crescimento pagetoide sejam fortes critérios diagnósticos, a presença de células neoplásicas logo abaixo da membrana basal, mesmo sem atividade juncional, levanta a preocupação de uma neoplasia melanocítica (SMITH et al., 2002; MUNDAY; KIUPEL; LOEHR, 2017; SMEDLEY et al., 2022).

Células neoplásicas pouco diferenciadas frequentemente contém pouco ou nenhum pigmento de melanina. Os núcleos frequentemente contém múltiplos nucléolos distintos, exibem anisocariose moderada a acentuada e têm padrões de cromatina

variáveis, semelhantes aos observados citologicamente (MUNDAY; KIUPEL; LOEHR, 2017; SMEDLEY et al, 2022).

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).

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 contagem mitótica demonstrou ser um indicador prognóstico confiável para neoplasias melanocíticas cutâneas e orais caninas em vários estudos (SMEDLEY et al., 2011; LACROUX et al., 2012; LAVER et al., 2018; PORCELLATO et al., 2020).

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).

Melanocitomas dérmicos podem ter uma morfologia redonda, epitelióide ou poligonal ou fusocelular, e casos raros podem ter morfologia de células dendríticas ou de balão. 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).

2.5 Imunogenicidade

Melanomas são neoplasias fortemente imunogênicas e isso é reforçado pela observação de alguns fatores como: regressão parcial ou completa de melanomas primários, marcada infiltração por linfócitos (principalmente linfócitos T) e a presença de células T, isoladas de melanomas em regressão, com acentuada atividade citolítica contra melanomas autólogos (MUKHERJI, 2013).

Em contrapartida a esta imunogenicidade, os melanomas malignos possuem diversos mecanismos de evasão imunológica e estes têm sido alvo de inúmeras pesquisas recentes no campo da imunologia tumoral. Tanto a imunidade inata, quanto a adaptativa são necessárias para a prevenção do desenvolvimento neoplásico (VESELY et al., 2011) e uma falha na vigilância imunológica pode permitir o aparecimento e desenvolvimento de neoplasias (ATHERTON et al., 2016).

As células neoplásicas, incluindo-se as células do melanoma, utilizam dois mecanismos básicos para escapar ou diminuir a resposta imunológica: (1) perda da expressão de antígenos, e (2) inibição ativa das respostas imunes. A perda da expressão de antígenos ocorre através do processo de imunomediação, no qual as células tumorais suprimem a expressão de determinados antígenos imunogênicos, mantendo seu fenótipo inalterado ou ainda, tornando-se mais capazes de crescer em relação às não modificadas.

Já a inibição da resposta imune está associada à síntese e secreção de citocinas imunossupressoras, como a Interleucina-10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento β (TGF- β), observada em células de melanoma (MUKHERJI, 2013; ABBAS et al., 2015).

Padrões intrínsecos de resposta imune do hospedeiro e leucócitos infiltrados podem guiar a progressão do câncer (DE NARDO e COUSSENS, 2007). Em seres humanos e cães, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) foram identificados como componentes importantes do microambiente tumoral, uma vez que são uma proporção importante do infiltrado leucocitário, promovendo a invasão e migração de células tumorais, bem como suprimindo as respostas antitumorais (POLLARD, 2004; CONDEELIS e POLLARD, 2006; RAPOSO et al., 2014).

Durante o desenvolvimento do câncer há uma ruptura nas interações intercelulares normais dos tecidos, e ao passo que a neoplasia adquire a capacidade de contornar os sinais de normalização do microambiente, este evolui para acomodar o tumor em crescimento. Como componentes desse microambiente tumoral podemos citar os macrófagos, as células imunossupressoras, os fibroblastos e a vasculatura, dentre outros componentes de suporte (QUAIL; JOYCE, 2013).

Os melanomas em cães apresentam diferentes comportamentos biológicos dependendo da localização. Em geral, melanomas orais e leito ungueal têm um pior prognóstico quando comparados aos melanomas cutâneos de outras localizações, embora a localização apenas não deva ser utilizada como um fator prognóstico (SMEDLEY et al., 2022). As metástases ocorrem por via linfática em direção a linfonodos regionais e pulmão, podendo espalhar-se para locais como coração, sistema nervoso central e baço (GOLDSCHMIDT; GOLDSCHMIDT, 2020).

Smedley et al. (2011) realizaram uma ampla revisão de diversos marcadores prognósticos em neoplasias melanocíticas caninas. Comparando-se o tempo de sobrevida com o tamanho da neoplasia, observaram-se resultados controversos, excluindo-se o tamanho da neoplasia como um possível marcador prognóstico. A atipia celular se mostrou relevante para o prognóstico, entretanto, tecnicamente este é um parâmetro subjetivo, o que poderia resultar em falta de padronização dos resultados e interpretação destes. Enquanto o índice mitótico apresentou correlação com a sobrevida em mais de 50% dos casos de melanomas caninos, o grau de inflamação e/ou necroses não foram bons indicadores. Diante destes dados, especialmente devido à subjetividade interpretativa de diversos aspectos morfológicos, os autores indicam que mais de um parâmetro seja utilizado.

2.6 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 mais de 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). 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 do melanócito com coloração citoplasmática (COLMENARES-ROLDAN; VELÁSQUEZ; VARGAS, 2008., ORDONEZ, 2014).

2.7 Macrófagos associados a tumores (TAMs)

Os macrófagos são células cruciais na detecção, fagocitose e destruição de materiais estranhos e endógenos, patógenos, mas também de células cancerígenas. Além disso, juntamente com a sua atividade fagocítica, podem participar na imunidade adaptativa, recrutando linfócitos e apresentando antígenos às células T (PAN et al., 2020).

Muito tem se estudado a respeito da plasticidade dos macrófagos e seu papel no crescimento das neoplasias. Os macrófagos podem alterar seu estado de polarização dependendo das condições fisiológicas (QUAIL; JOYCE, 2013). Macrófagos de ativação clássica, denominados de M1, produzem citocinas pró-inflamatórias e têm papel antitumoral, participando da apresentação de antígenos (BISWAS; MANTOVANI, 2010). De forma antagônica, macrófagos de ativação alternativa, M2, secretam citocinas anti-inflamatórias, resultando em função pró-tumorigênica (BISWAS; MANTOVANI, 2010).

Ao analisar o perfil de infiltração tumoral por macrófagos em 43 melanomas de úvea, Bronkhorst et al. (2011) observaram significativa correlação entre presença de infiltração rica em macrófagos M2 e um pior prognóstico. Neste mesmo sentido, um estudo avaliou 202 melanomas cutâneos quanto à invasão vascular (vasos linfáticos e sanguíneos), a densidade de vasos e a presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs) e evidenciou associação significativa entre alta contagem de macrófagos, neovascularização e crescimento primário do tumor (STORR et al., 2012).

Na medicina veterinária, estudos que correlacionam a presença e a contagem de TAMs ao prognóstico são escassos. Recentemente, Monteiro et al. (2018) utilizaram marcadores para TAMs em tumores mamários caninos e observaram que a contagem de macrófagos estava relacionada com diversos parâmetros clínico-patológicos, bem como ao tempo de sobrevivência global dos animais. Outro achado relevante foi a relação direta entre a predominância de subpopulações M1 em neoplasias benignas, enquanto subpopulações M2 foram observadas em neoplasias malignas.

A presença de TAMs no melanoma e seu papel na progressão e o prognóstico do tumor foram avaliados em humanos (FUJIMURA; AIBA, 2020) e, nos últimos anos, o papel potencial de dessas células como alvos de futuras imunoterapias têm sido sugerido (PATHRIA et al., 2019).

2.8 Proteína 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).

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).

Vários estudos demonstraram que o índice Ki-67, determinado por imunohistoquímica (IHQ), prediz o prognóstico de neoplasias melanocíticas cutâneas e orais/labiais (LAPRIE et al., 2001; BERGIN et al., 2011; LACROUX et al., 2012; IUSSICH et al., 2017; SMEDLEY et al., 2021; CAMERINO et al., 2022).

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 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., 2022).

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.

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).

A fração de crescimento tumoral é medida através do número de núcleos de células neoplásicas marcadas pelo anticorpo anti-Ki-67. Diferente dos critérios histológicos abordados acima, o índice de Ki-67 apresenta resultados mais objetivos. Este índice de marcação é recomendado para todas as neoplasias melanocíticas, especialmente para as que apresentam discordância entre parâmetros morfológicos, uma

vez que tem sido demonstrada estatisticamente correlação com o prognóstico clínico (SMEDLEY et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Histopatologia e Imuno-histoquímica do Setor de Anatomia Patológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (SAP/UFRRJ) em parceria com o Instituto Federal Farroupilha *Campus* Frederico Westphalen.

3.2 Amostras

As amostras foram obtidas com base em biópsias e necropsias encaminhadas aos laboratórios do SAP, e, um caso, encaminhado do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade Federal da Bahia (UFBA), com termo de consentimento livre e esclarecido. Foram utilizados blocos de parafina contendo fragmentos de nódulos, de linfonodos regionais e demais órgãos quando provenientes de necropsias, com e sem metástases detectadas de cães com neoplasias melanocíticas.

Em relação às necropsias, foram priorizadas as de cães com melanomas malignos que morreram em decorrência da doença ou foram eutanasiados segundo recomendação do clínico responsável. As necropsias foram realizadas mediante autorização do proprietário e/ou solicitação do médico veterinário, de acordo com o Guia da Técnica de Necropsia dos Animais Domésticos (BARROS, 1988).

3.3 Histopatologia

Órgãos e tecidos foram avaliados macroscopicamente e os fragmentos colhidos foram fixados em solução formalina tamponada a 10%. Após processamento de rotina, os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados em micrótomo rotativo a 3 µm, corados pela hematoxilina e eosina e observados em microscópio óptico. Foram selecionados no total 25 casos de neoplasias melanocíticas em cães.

Os melanomas foram classificados de acordo com a descrição dos tumores de animais domésticos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998) em: melanocitomas, melanomas epitelióides, melanomas fusiformes e melanomas mistos. Uma segunda classificação baseada no fenótipo dividiu as neoplasias em melanoma pigmentado, melanoma não pigmentado e melanoma parcialmente pigmentado conforme os critérios propostos por Goldschmidt e Goldschmidt (2017). Adicionalmente foram avaliadas as áreas de necrose, úlceras, hemorragia, infiltrado inflamatório, 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 (FN) 20.

3.4 Imuno-histoquímica

Foram submetidos à análise imuno-histoquímica fragmentos emblocados em parafina de melanocitomas, melanomas malignos orais e cutâneos, linfonodos regionais, com e sem metástase, dos animais com neoplasias melanocíticas. Adicionalmente,

quando provenientes de necropsias, fragmentos de pulmão, fígado, baço, rins e encéfalo, com ou sem metástase, também foram analisados.

Seções das neoplasias, linfonodos e demais órgãos foram desparafinadas, hidratadas e submetidas à recuperação antigênica por calor com TRIS Edta. Para bloqueio da peroxidase endógena e das reações inespecíficas foi utilizada solução de peróxido de hidrogênio a 3% e leite em pó desnatado, respectivamente. As seções foram incubadas com os anticorpos (Tabela 1) por 2:30h em temperatura ambiente, lavadas com PBS, reveladas com o cromógeno magenta, contra coradas com hematoxilina de Harris e observadas em microscópio óptico.

Um caso previamente diagnosticado como sugestivo de melanoma pouco pigmentado de pele, foi submetido a imuno-histoquímica com anticorpo Melan-A e obteve resultado positivo.

A fração de crescimento tumoral ou o índice de Ki-67, foi avaliada através da marcação nuclear das células neoplásicas pelo anticorpo anti-Ki67. A contagem foi feita por três métodos diferentes. Para neoplasias melanocíticas da cavidade oral o índice de Ki-67 foi obtido pelo número médio de núcleos positivos em cinco áreas de 1mm² cada (foi realizado com o auxílio de uma objetiva com retículo). Neoplasias com índice ≥ 19.5 tem um prognóstico pior e neoplasias com índice menor que 19.5 apresentam prognóstico favorável (BERGIN et al., 2011).

Para as neoplasias cutâneas, o índice foi obtido através da porcentagem de núcleos positivos em 500 células por 5 campos. Neoplasias com índices $\geq 15\%$ esperam-se um prognóstico pior e com índice menor que 15%, prognóstico favorável (LAPRIE et al., 2001).

Alternativamente, também foi realizado o índice de Ki-67 após seleção de 10 campos com maior celularidade e fora das áreas de necrose, quando presente (Obj. 40x, FN 22, 2,37mm²), independentemente da localização, como o descrito por Carvalho et al. (2021), realizando a porcentagem de núcleos positivos em 10 campos (Obj. 40x, FN 22, 2,37mm²), considerando que neoplasias com índice de Ki-67 acima de 15% espera-se um pior prognóstico.

A leitura das lâminas foi realizada no microscópio óptico Axio Scope. A1- Zeiss FN 22 (2,37mm²). A contagem de núcleos positivos foi realizada de forma manual, com auxílio do software ImageJ. Para controle, foi utilizado um caso com diagnóstico confirmado de mastocitoma grau 3, alto grau, proveniente do acervo de blocos do SAP/UFRRJ.

Foi utilizado o anticorpo anti-CD206, para contagem da subpopulação de macrófagos M2 (TAMs) nas neoplasias, nos linfonodos e demais órgãos quando disponíveis. Os TAMs foram contados em cinco áreas com o máximo de infiltração leucocitária com ampliação de 40x, sendo o número total a soma das cinco áreas como proposto por Monteiro et al. (2018). Para controle foi utilizado um caso de melanoma misto, proveniente do acervo de blocos do SAP/UFRRJ com população de macrófagos evidentes a coloração de hematoxilina e eosina.

Tabela 1. Anticorpos utilizados.

Anticorpo	Empresa	Clone	Diluição
<i>Melan-A</i>	Dako	A103	Diluído
<i>CD206</i>	Beckman Coulter	3.29B1.10	1:100
<i>Ki-67</i>	Dako	MIB1	Diluído

3.5 Análises

A contagem de macrófagos e o índice de Ki-67 (cavidade oral, pele e metástases) foram comparados aos demais achados, como: localização anatômica da neoplasia, índice mitótico, diagnóstico, tipo celular, presença ou ausência de úlcera, necrose, inflamação e hemorragia. Comparamos as variáveis utilizando critérios de análise gráfica com Boxplots, Mapas de Calor e Gráficos de Barras.

4. RESULTADOS

Foram utilizados 25 casos previamente diagnosticados como neoplasia melanocítica em cães, destes, seis correspondiam a necropsias, quatro eram melanocitomas e 21 melanomas, todos pigmentados. Em relação ao sexo, nove eram fêmeas e 16, machos. As raças mais prevalentes foram Rottweiler e Beagle (três casos cada) e cães sem raça definida (SRD) totalizaram 12 animais. A idade variou de sete a 17 anos, ou seja, todos os cães eram adultos.

Dos 25 casos de neoplasias melanocíticas incluídas neste estudo, 24 tinham descrições referentes à localização (Gráfico 1). Desses, 13 apresentavam-se na pele, 11 em cavidade oral e um, proveniente de necropsia, foi observado em encéfalo sem conhecimento sobre o sítio de origem.

Em 18 casos foram informadas metástases em linfonodos regionais (10 com origem na cavidade oral, e 8, pele) (Gráfico 2), em outros seis casos foram descritos metástases no pulmão (todos primários de cavidade oral) (Figura 1, C e F), e, em três destes, havia metástase também para outros órgãos, como: baço, rins e encéfalo (todos primários de cavidade oral) (Figura 1, D e E).

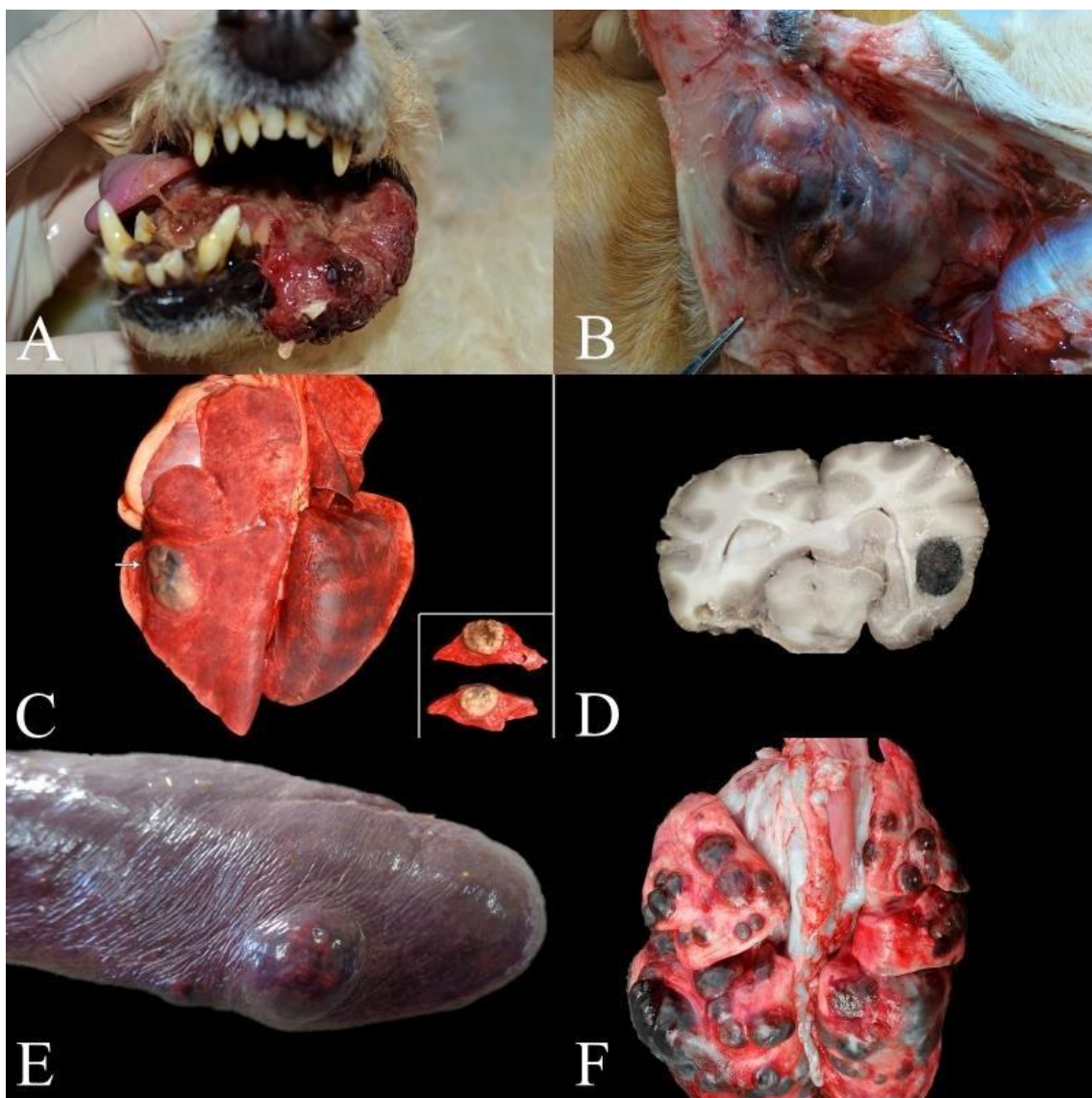


Figura 1. Aspectos macroscópicos de melanomas diagnosticados em cães no SAP/UFRRJ: A- Nódulo por vezes enegrecido e irregular em cavidade oral de cão, Poodle, diagnosticado com melanoma pigmentado B- Metástase de melanoma pigmentado no linfonodo submandibular de cão. C- Nódulo focal, ligeiramente elevado, parcialmente delimitado, amarelo com áreas pretas multifocais no lobo caudal esquerdo. Inset: superfície de corte de nódulo pulmonar. D- Nódulo focal firme, preto e parcialmente delimitado, expandindo as substâncias telencefálicas cinzenta e branca (cérebro fixado em formol). E- Metástase de melanoma pigmentado. Nódulo com 3,0 cm de diâmetro localizado no baço. F- Metástase pulmonar de melanoma pigmentado. Observam-se nos lobos pulmonares, nódulos enegrecidos multifocais a coalescentes. Com tamanhos de 0,5 cm a 5,0 cm. **Arquivo SAP/UFRRJ.**

A avaliação das características histopatológicas foi realizada nos 25 casos. Os aspectos histológico e morfológico da neoplasia (Figura 2) foram classificados de acordo as regras da OMS (1998) e subdivididos em: melanomas epitelióides, 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 25 neoplasias avaliadas, foram observados dois casos com característica fusiforme, quatro epitelioides e 19 mistos.

O pleomorfismo foi moderado a acentuado em 19 dos 25 casos. Para contagem da mitose foi realizada a média de todos os casos, totalizando uma média 14,2 mitoses (Obj. 40x, FN 22, 2,37mm²), todos da variante maligna. Não foram observadas mitoses na variante benigna, melanocitoma.

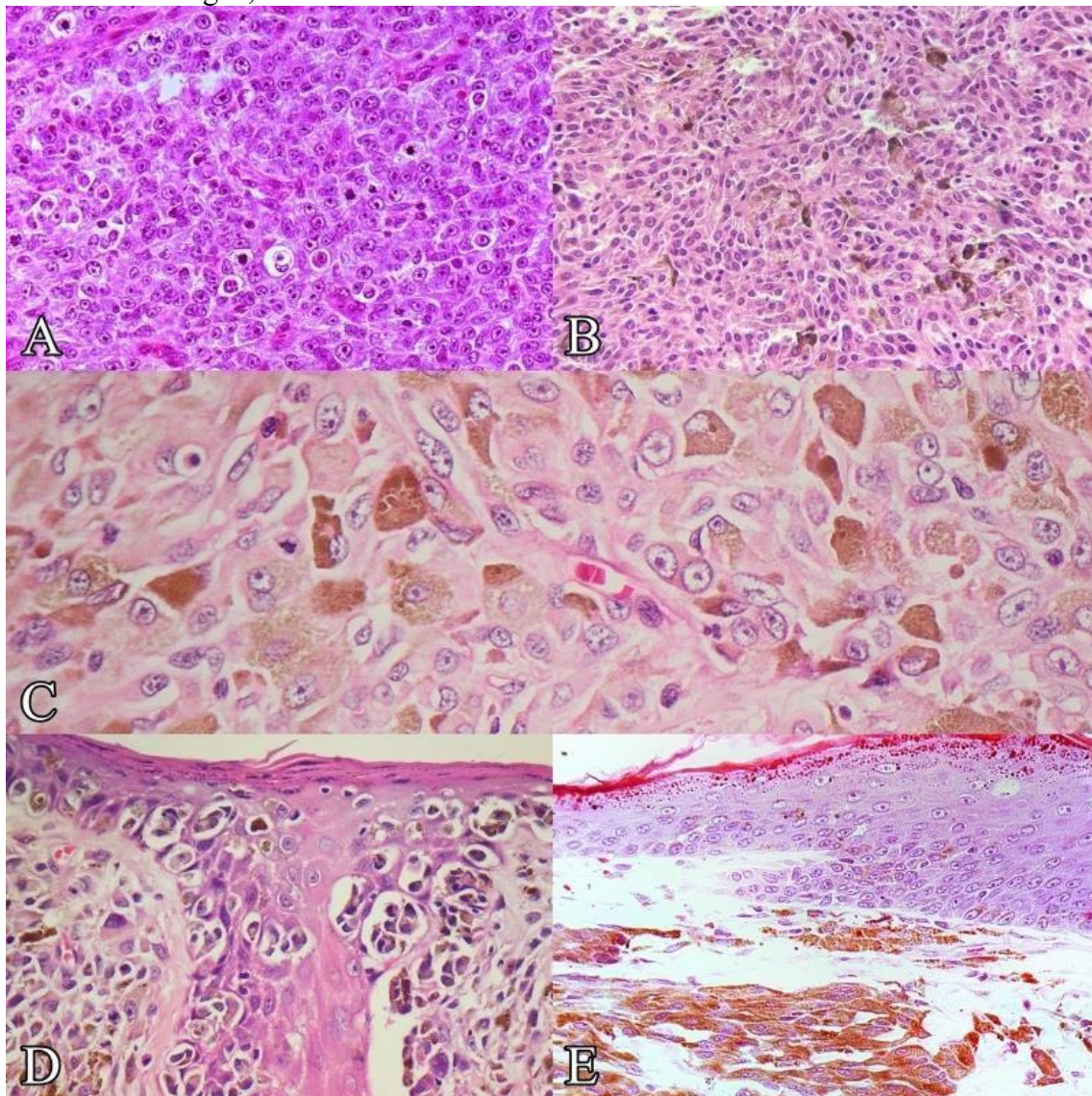


Figura 2. Aspectos microscópicos de melanoma em canino: A- Melanoma epitelióide não pigmentado, pobremente diferenciado. Pele. Obj.40x. B- Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj.20x. C- Melanoma epitelióide parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Pele. Obj.40x. D- Melanoma epitelióide parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado com atividade juncional. Pele. Obj.40x. E- Melanocitoma. Pele. Obj. 10x. **Fonte:** SAP/UFRRJ. **Coloração de hematoxilina e eosina.**

Dos 25 casos, 20 apresentaram imunorreatividade ao Ki-67 (Figura 3, A, B e C), 21 apresentaram imunorreatividade ao CD206 (Figura 5, D, E e F).

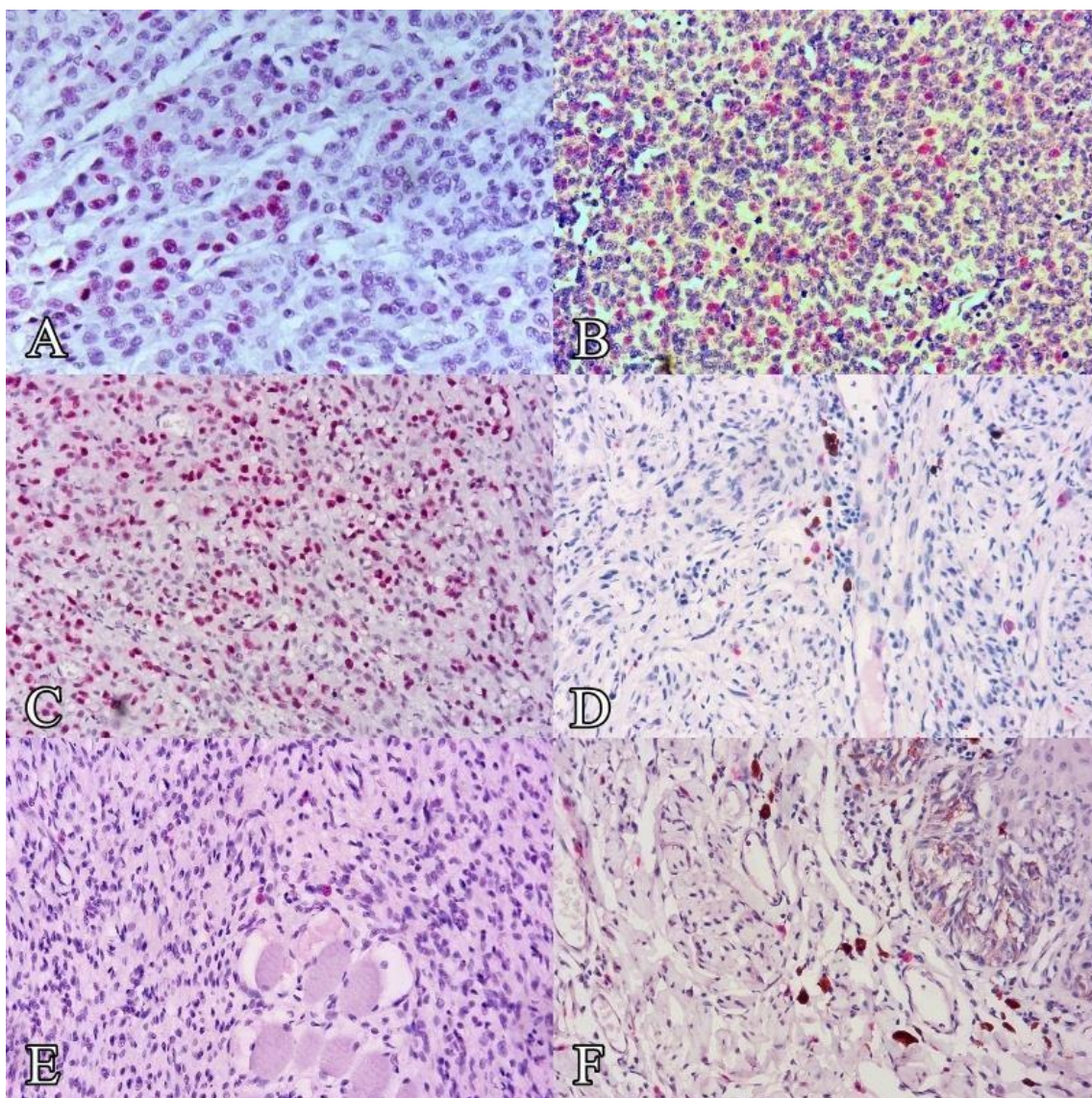


Figura 3. Imunorreatividade aos anticorpos Ki-67 e CD206 nas neoplasias melanocíticas. **A-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 40x. **B-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 20x. **C-** Imunorreatividade ao Ki-67 em Melanoma misto, parcialmente pigmentado, moderadamente diferenciado. Cavidade oral. Obj. 20x. Observa-se núcleos celulares imunorreativos corados pelo cromógeno magenta. **D-** Imunorreatividade ao anticorpo CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj 20x. **E-** Imunorreatividade ao anticorpo CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj. 40x. **F-** Imunorreatividade ao CD206 em Melanoma misto parcialmente pigmentado, pobremente diferenciado. Cavidade Oral. Obj 20x. Observam-se citoplasmas de macrófagos corados pelo cromógeno magenta, entremeando a neoplasia. **Fonte:** SAP/UFRRJ. **Cromógeno magenta. Contracoloração com hematoxilina.**

Dos 20 casos imunorreativos ao Ki-67 (Tabela 2), 11 eram provenientes da cavidade oral, e os demais, pele (Gráfico 3). Destes 20, 13 obtiveram a fração de crescimento elevada segundo os parâmetros da literatura (seis eram da cavidade oral e sete, da pele). Dois desses casos eram do tipo histológico epitelióide e os demais, mistos. O Ki-67 esteve elevado em 12 casos de melanomas parcialmente pigmentados e, em um caso de melanoma pigmentado (Gráfico 4). Em 11 casos, foram observadas ao menos 10 mitoses em 10 campos de maior aumento (Obj.40x, 2,37mm²) (Gráfico 5). O

pleomorfismo observado foi moderado a acentuado em todos os casos com fração de crescimento superior a 15% (CARVALHO et al., 2021).

Havia a associação a um infiltrado inflamatório em seis casos (quatro nódulos na pele e dois na cavidade oral) (Gráfico 6). Úlcera foi observada em quatro casos (dois melanomas de pele e dois da cavidade oral) (Gráfico 7), necrose estava presente em sete casos (quatro na pele, dois na cavidade oral) (Gráfico 8). Com relação às metástases, em 11 linfonodos verificou-se elevada proliferação celular (Gráfico 9) e, destes, seis casos eram metástases da cavidade oral (Gráfico 10) e cinco, metástases de melanomas cutâneos (Gráfico 11). Além disso, em dois pulmões com metástases de melanomas de cavidade oral, também observou-se elevado índice de Ki-67.

Dos 25 casos analisados no estudo, 20 se mostraram positivos para o anticorpo CD206 (Tabela 2). E, em 17 casos, foram observados mais de 10 macrófagos positivos em cinco campos de maior aumento. Desses, 11 estavam localizados na pele (quatro eram melanocitomas) e, outros seis, na cavidade oral (Gráfico 12). Em um caso de melanoma pigmentado de cavidade oral, foram observados 28 macrófagos CD206+ no nódulo e 30 macrófagos CD206+ no linfonodo. Adicionalmente, houve um caso de pele com elevada contagem de macrófagos CD206+, sendo 28 observados no nódulo e 12 no linfonodo.

Tabela 2. Imunorreatividade das neoplasias melanocíticas ao Ki-67 e ao CD206 (continua).

Registro	Diagnóstico	Localização	Ki-67 (Carvalho et al., 2021)	Ki-67 (Laprie et al, 2001)	Ki-67 (Bergin, 2011)	TAM's
41115 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>70,40%</u>		→ 84,4	29
41115 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>43,40%</u>		→ 42,2	2
40135 nódulo	Melanoma	Pele	<u>42,30%</u>	64%		24
40135 linfonodo	Melanoma	Pele	<u>29,30%</u>	44,80%		14
41385 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>62,40%</u>	95,60%		12
40458 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>18,20%</u>		→ 26,2	12
40458 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>15,10%</u>		→ 24,4	16
30109 pulmão	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>22,60%</u>		→ 22,2	13
39109 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>84,10%</u>		→ 110,2	22
40280 pulmão	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>19,20%</u>		→ 32,2	0
40280 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	13,80%		→ 21,2	7
36446 linfonodo	Melanoma	Pele	8,80%	12,40%		16
36446 nódulo	Melanoma	Pele	<u>25,60%</u>	34,60%		26
34685 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>16,60%</u>	23,40%		30
34685 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	0,00%	0,00%		28
36649 nódulo	Melanoma	Pele	3,30%	6,00%		30
36649 pulmão	Melanoma	Pele	8,30%	10,40%		33
36649 linfonodo	Melanoma	Pele	<u>47,90%</u>	64%		19
39485 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>29,40%</u>		→ 29	6
39485 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>43,20%</u>		→ 50,4	9
38967 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>29,40%</u>		→ 35,6	28
38967 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	<u>15,30%</u>		→ 27,6	12

41320 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>30,20%</u>	37,40%		12
41320 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>17,10%</u>	25%		11
42819 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>85,70%</u>	94,80%		0
42819 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Pele	<u>58,70%</u>	70,40%		10
34919	Melanocitoma	Pele	0%	0%		19
36034	Melanocitoma	Pele	0%	0%		11
36147	Melanocitoma	Pele	0%	0%		24
38941	Melanocitoma	Pele	0%	0%		16
41447 nódulo	Melanoma	Pele	0%	0%		3
41447 linfonodo	Melanoma	Pele	0%	0%		1
37371 linfonodo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	2,60%		5,2	4
37371 nódulo	Melanoma parcial. pigmentado	Cav. Oral	2,60%		3,6	12
40679 nódulo	Proliferação melanocítica	Pele	9,40%	14%		14
40679 linfonodo	Proliferação melanocítica	Pele	5%	7,40%		0

Parcial: parcialmente. Cav: cavidade.

De maneira geral, não observou-se relação entre Ki-67 e o tipo celular das neoplasias melanocíticas (melanoma misto, melanoma fusiforme ou melanoma epitelióide.).

Melanomas parcialmente pigmentados (aqueles com pouco pigmento) possuem valores de Ki-67 mais elevados do que aqueles fortemente pigmentados (neste estudo, separados no conjunto de melanomas).

Os melanomas de pele tiveram maior variabilidade de dados do que aqueles diagnosticados na cavidade oral. Na pele, o Ki-67 tem valores mais elevados (>15%) quando úlceras estão presentes. Não há relação entre os valores de Ki-67 na pele com a presença de necrose. Além disso, a mitose nos casos de melanomas cutâneos, não se relacionou com valores elevados de Ki-67 (esta foi baixa mesmo em casos com Ki-67 baixo (<15%) ou elevado (>15%)).

Com relação aos melanomas de cavidade oral, os valores de Ki-67 foram elevados (>19,5) quando a necrose estava presente. Ao contrário da presença de inflamação para a mesma localização, uma vez que o Ki-67 mostrou pouca variação.

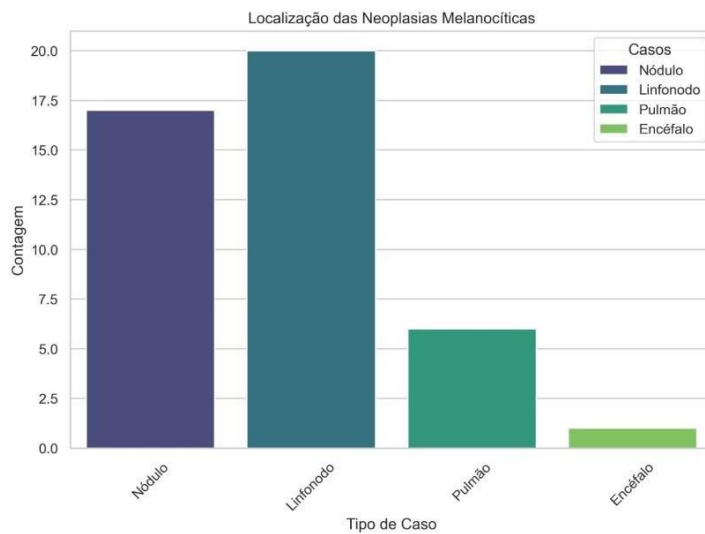
A hemorragia foi uma variável que não mostrou ter relação com o valor de Ki-67 independente da localização da neoplasia.

A fração de crescimento celular também foi elevada nas metástases nodais. Uma vez que tanto nas metástases nodais das neoplasias cutâneas ou orais, os linfonodos apresentaram valores elevados de Ki-67. Nestes linfonodos com alto índice de fração de crescimento, também foi observado elevado índice de mitose.

Com relação aos valores de CD206+, esse foi mais elevado nos casos onde a fração de crescimento celular também se mostrou elevada (Gráfico 13), principalmente nas metástases nos linfonodos. Tanto nos melanomas orais (Gráfico 14), como cutâneos (Gráfico 15), havia maior infiltração de TAMs quando estes possuíam elevada fração de crescimento celular, principalmente nos linfonodos. Consideramos que, nos casos onde havia ao menos 10 macrófagos CD206+ em cinco campos de maior aumento, (obj. 40x, FN 22, 2,37mm²) houve maior correlação com a fração de crescimento celular.

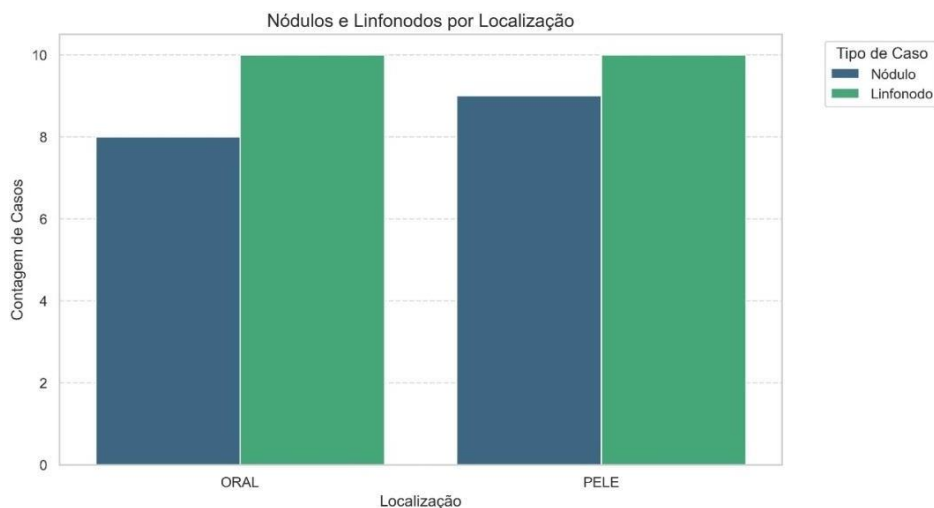
A avaliação imuno-histoquímica revelou que macrófagos associados a tumores foram mais frequentemente observados nos casos de melanomas cutâneos.

Gráfico 1. Localização das neoplasias melanocíticas observadas no estudo.



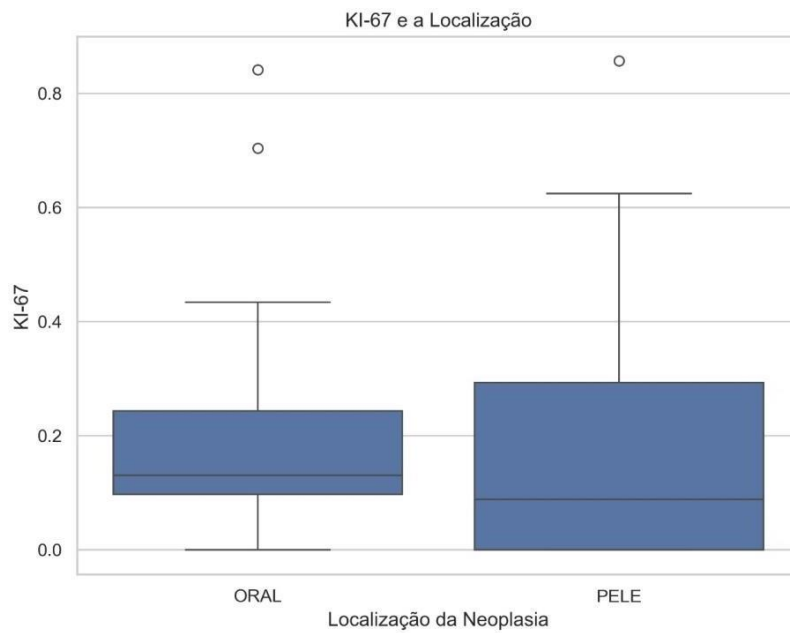
No presente estudo, 11 casos de neoplasias melanocíticas foram provenientes da cavidade oral e 13, de pele, totalizando 24 casos com a descrição do sítio de origem. Além dos sítios primários, também foram observadas metástases, onde 18 correspondiam a linfonodos e em seis casos, pulmões.

Gráfico 2. Localização das neoplasias melanocíticas (nódulo primário e linfonodos).



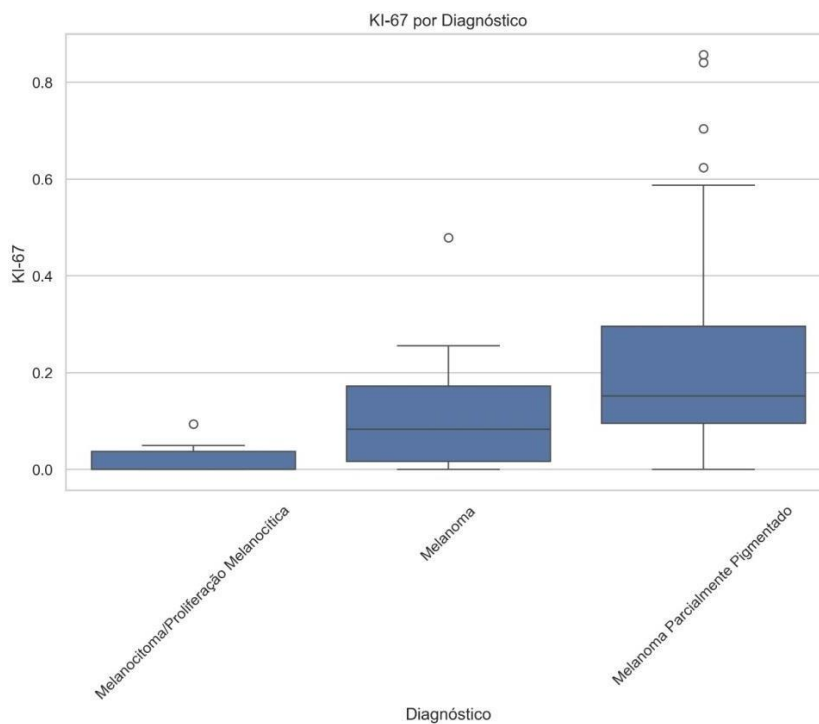
Os linfonodos metastáticos dos casos de melanomas de cavidade oral, totalizaram 10, assim como àqueles provenientes da pele, totalizaram oito.

Gráfico 3. Ki-67 na Cavidade Oral e na Pele.



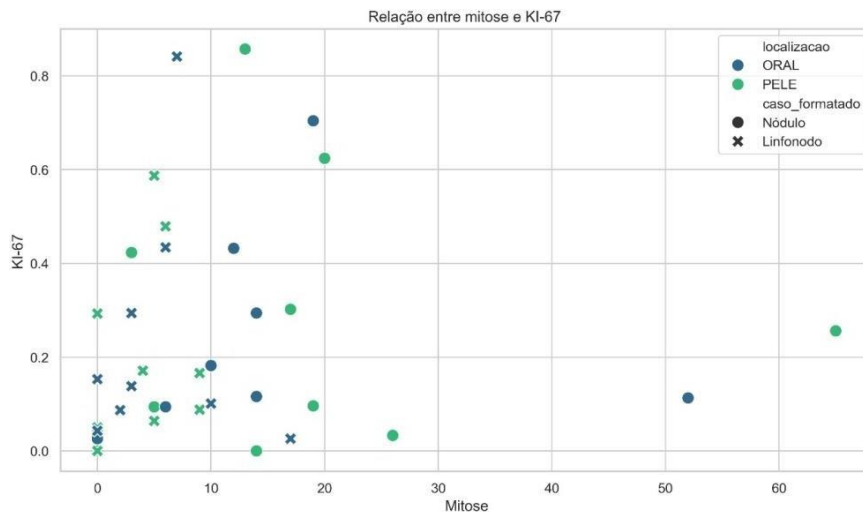
O Ki-67 foi elevado em 11 casos da cavidade oral e em nove casos, de pele. Porém, nos casos localizados na pele, o Ki-67 teve maior variabilidade (os valores individuais do conjunto de dados estão mais afastados uns dos outros e da média).

Gráfico 4. Ki-67 e a relação com o diagnóstico.



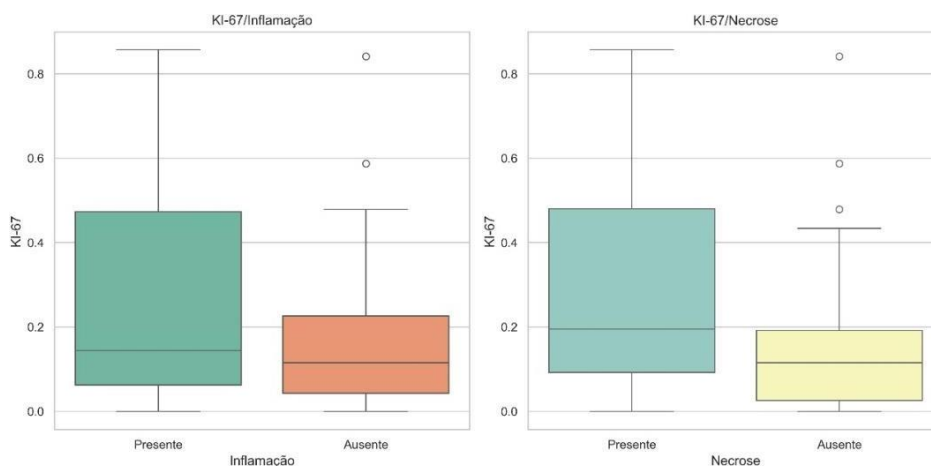
Quando o diagnóstico é “melanoma parcialmente pigmentado”, no que diz respeito a presença de pouco pigmento, tende a ter maiores valores de Ki-67 em relação ao “melanoma” (aqui entendidos como aqueles fortemente pigmentados).

Gráfico 5. Associação de mitose e fração de crescimento celular.



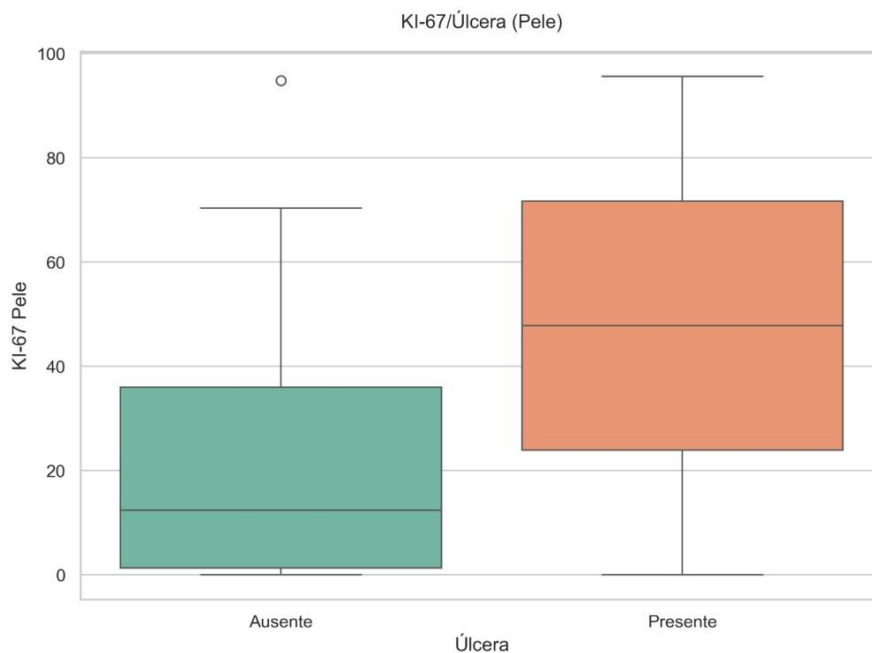
A dispersão sugere que a relação entre mitose e Ki-67 varia de acordo com a localização. As metástases nos linfonodos concentram valores mais elevados, especialmente nos casos onde há um índice de mitose maior.

Gráfico 6. Ki-67 e a relação com inflamação e necrose.



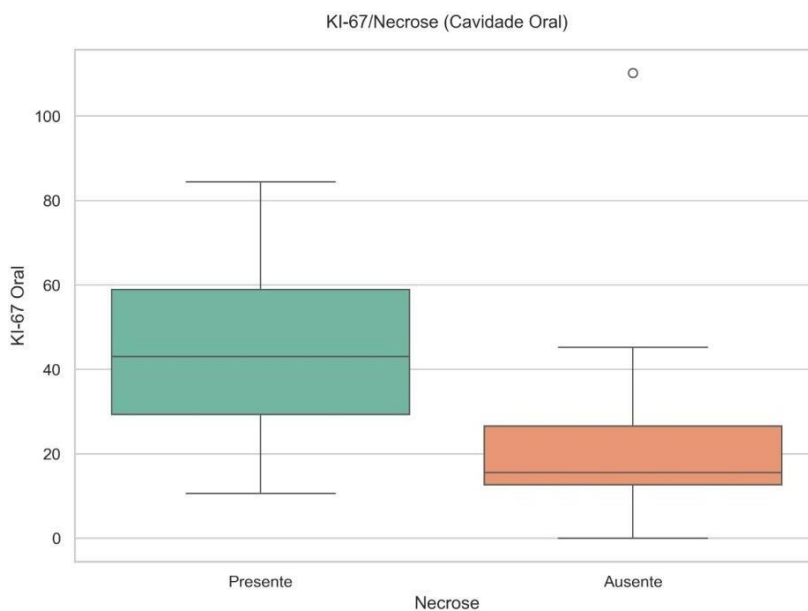
O valor do Ki-67 tende a ser mais elevado nos casos em que há a presença de necrose, isso é observado pela distância entre as medianas, além disso, a caixa da necrose presente está maior que a ausente, indicando alta variabilidade.

Gráfico 7. Ki-67 na pele e a presença de úlcera.



Nos casos com úlcera presente, a fração de crescimento celular tende a ser maior. As caixas indicam variabilidades parecidas.

Gráfico 8. Ki-67 e a presença de necrose nos casos da cavidade oral.



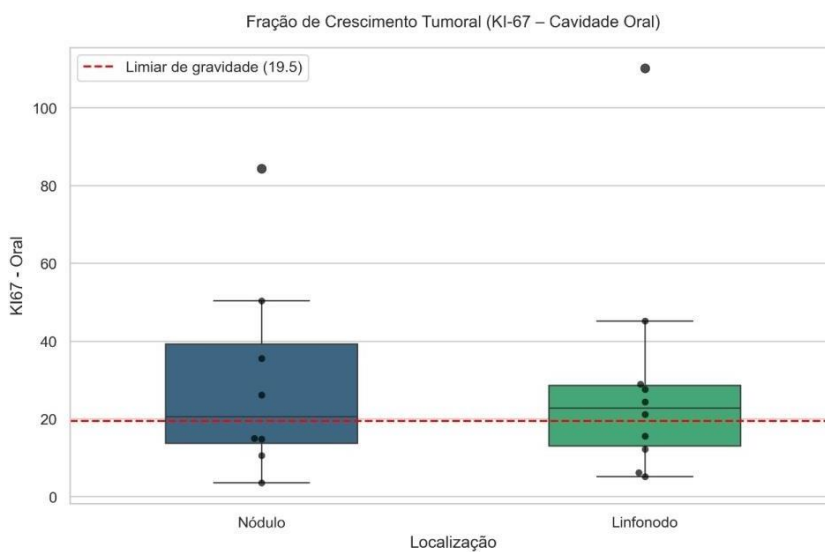
A fração de crescimento celular nos casos orais tende a ser maior quando a necrose é presente. Além disso, os conjuntos possuem baixa variabilidade.

Gráfico 9. Ki-67 por caso.



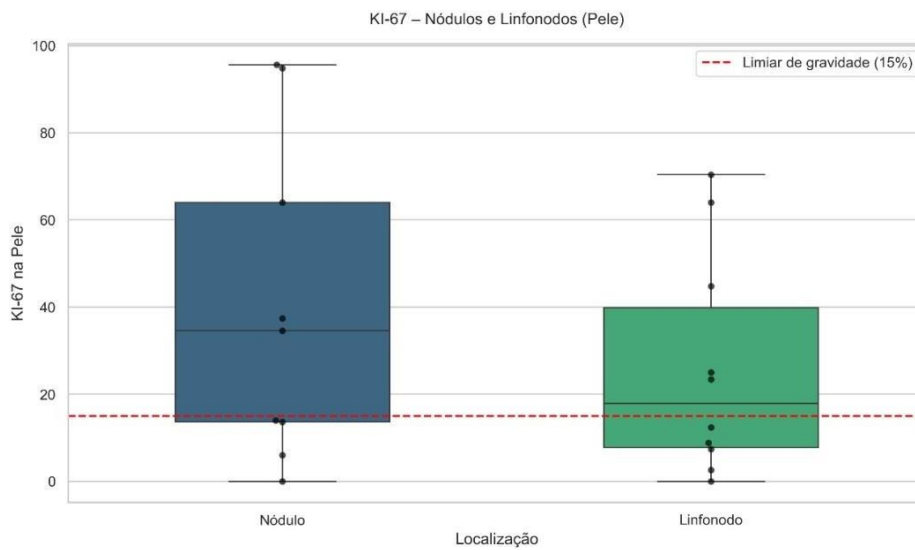
Linfonodos têm médias mais elevadas em todas as classes de imunorreatividade do Ki-67. Isso pode sugerir maior agressividade nos linfonodos.

Gráfico 10. Ki-67 na cavidade oral (nódulo primário e respectivos linfonodos).



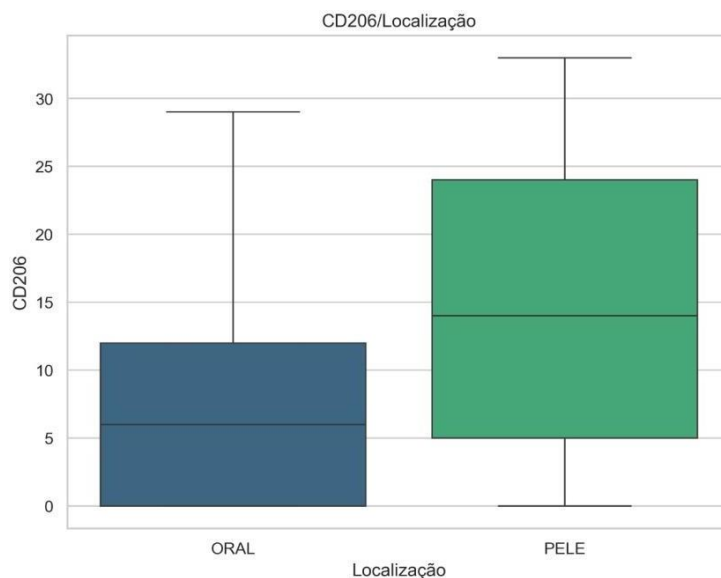
O boxplot mostra que linfonodos tendem a ter Ki-67 com maior variabilidade.

Gráfico 11. Ki-67 nos nódulos e linfonodos (Pele).



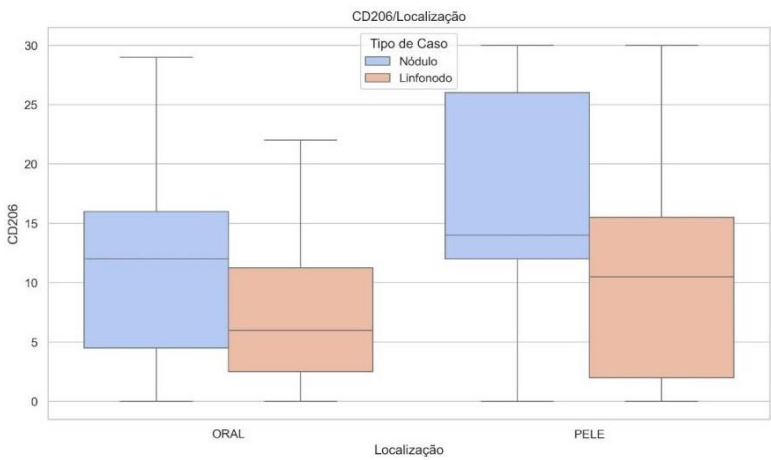
A linha de corte traçada (15%), permite observar que muitos linfonodos apresentam valores acima desse limite, sugerindo metástases com alto índice de crescimento celular na pele.

Gráfico 12. CD206 e a localização.



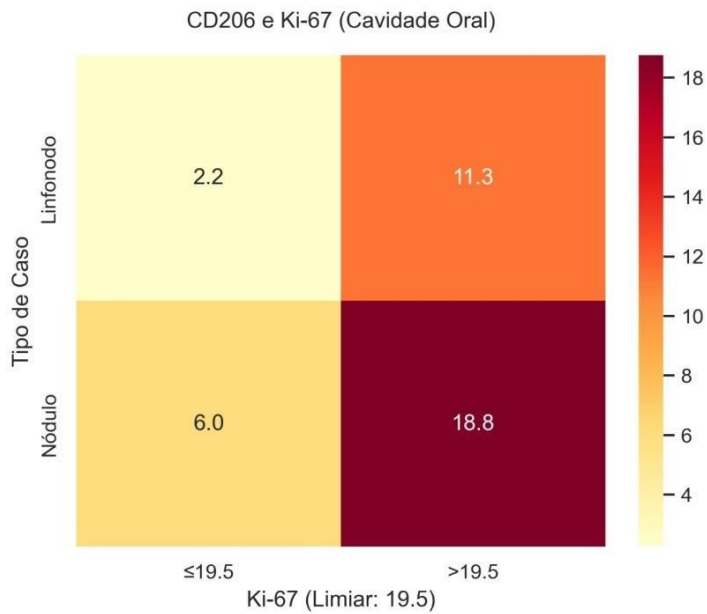
A imunoreatividade do CD206 tende a ser maior quando a localização da neoplasia é na pele, fato que se confirma, pois há uma grande distância entre as medianas. Além disso, temos uma maior variabilidade do valor do CD206 nos casos de pele.

Gráfico 13. Imunorreatividade ao CD206 nos sítios primários (pele e cavidade oral) e nos linfonodos.



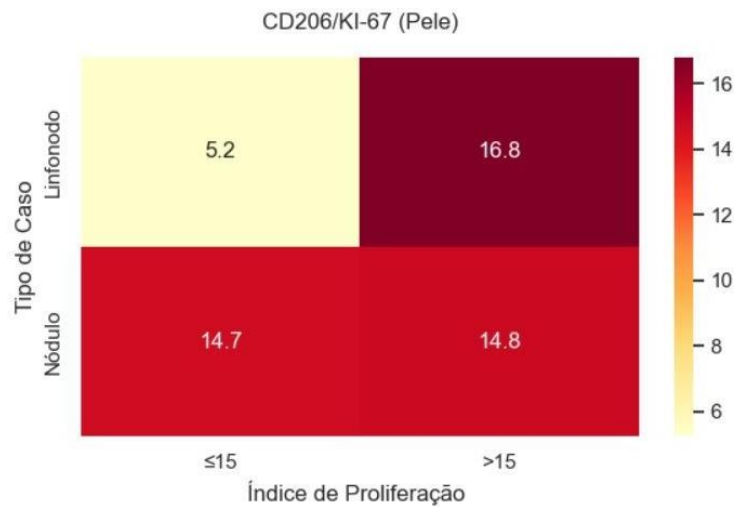
Observamos que os casos de neoplasias melanocíticas da pele tendem a ser mais graves.

Gráfico 14. Relação entre a imunorreatividade do CD206 e a fração de crescimento celular na cavidade oral.



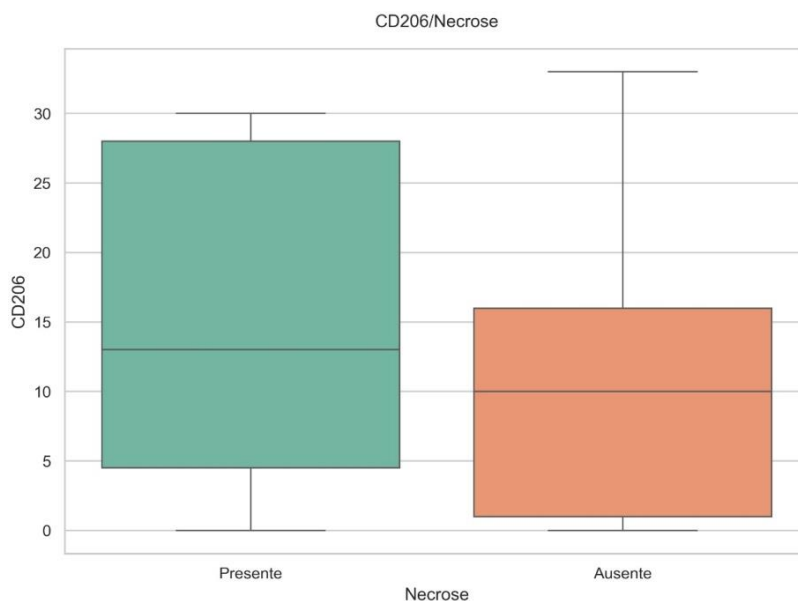
Média dos valores de CD206 em função da fração de crescimento celular (Ki-67) oral em nódulos e linfonodos. Valores mais elevados de CD206 estão levemente associados a maiores valores de Ki-67, principalmente nos linfonodos.

Gráfico 15. Relação entre a imunorreatividade do CD206 e a fração de crescimento celular na pele.



Nos casos de melanomas cutâneos, valores mais elevados de CD206 estão levemente associados a maiores valores de Ki-67, principalmente nos linfonodos.

Gráfico 16. CD206 e a presença de necrose.



A mediana dos dados CD206 quando a necrose é presente, está acima da classificação quando a necrose está ausente, indicando que os valores de CD206 tendem a ser maiores quando há necrose.

5. DISCUSSÃO

Tumores melanocíticos são comuns no cão, e a maioria deles é maligno (SPANGLER; KASS, 2006; BROCKLEY; COOPER; BENNETT, 2013; GILLARD, et al., 2014), correspondendo até 7% de todos os tumores malignos nessa espécie (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Os tumores melanocíticos correspondem a aproximadamente 4% de todas as neoplasias cutâneas em cães e a maioria corresponde a melanomas (HASSAN et al., 2022) que também representam a neoplasia mais frequente da cavidade oral nessa espécie (REYNOLDS, 2025). No presente trabalho, a variante maligna foi mais prevalente, totalizando 13 casos cutâneos e 11 na cavidade oral.

Todos os cães diagnosticados com neoplasias melanocíticas eram adultos com mais de sete anos de idade e não houve predileção por sexo. Dados semelhantes foram descritos por Porcellato et al., (2022) e Gola et al., (2024), que relataram uma idade média de 11,4 anos, mediana de 12 anos e variação entre 6 e 16 anos. Não houve predileção por sexo, resultado que se assemelha ao relatado por Sathathum et al. (2023). O início da forma maligna desse tumor em idade avançada pode sugerir que a tumorigênese e a progressão do tumor estão ligadas a mecanismos subjacentes relacionados à idade, ou seja, à medida em que os animais envelhecem, mutações genéticas cumulativas, vigilância imunológica diminuída e outros processos biológicos associados à idade contribuem para o desenvolvimento e a agressividade dos tumores malignos. Outro fator como o atraso no diagnóstico deve ser levado em consideração quando trata-se da prevalência de neoplasias malignas frente a variante benigna.

Raças com pele e mucosas pigmentadas são mais propensas a desenvolver melanomas (DOBSON, 2013; GILLARD, et al., 2014; VAN DER WEYDEN, et al., 2016). Neste estudo, a raça pura mais acometida, Rottweiler se encaixa na descrição dos autores acima. Outros estudos também reforçam a afirmativa de não haver associação entre o tipo de neoplasia e a raça ou o sexo do animal (SMEDLEY et al., 2022). Certas raças, incluindo Rottweilers, Labradores Retrievers, Golden Retrievers, Doberman Pinschers e Schnauzers, foram super-representadas com tumores melanocíticos, consistente com relatos anteriores (NISHIYA et al., 2016). Embora não tenha sido observada predileção por raça, essa informação deve ser interpretada com cautela devido ao tamanho relativamente pequeno da amostra dentro de grupos de raças específicas, como a alta proporção de cães sem raça definida.

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). Como relatado anteriormente, foi observado maior prevalência de metástase para linfonodos, seguida por pulmões, porém em um caso, encéfalo também estava acometido.

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 e deve ser avaliado em conjunto com outros fatores (SMEDLEY; SEBASTIAN; KIUPEL, 2022). 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.

A contagem mitótica demonstrou ser um indicador prognóstico confiável para neoplasias melanocíticas cutâneas e orais caninas em vários estudos (LAPRIE et al., 2001; LACROUX et al., 2012; LAVER et al. 2018; SILVESTRE et al., 2018; PORCELLATO et al., 2020; SMEDLEY et al., 2022; CAMERINO et al., 2022). Laver et al. (2018) propuseram que um limiar de índice mitótico de 20 figuras em 10 campos prevê um pior prognóstico. No que se trata de figuras de mitose, houve uma média de 14,2 mitoses (Obj. 40x, FN 22, 2,37mm²).

Para neoplasias melanocíticas cutâneas, uma contagem mitótica de 3 ou mais foi associada a tempo de sobrevida mais curto em comparação com neoplasias com contagem mitótica menor que 3 (LAPRIE et al., 2001; LACROUX et al., 2012; SILVESTRE et al., 2018). Já para neoplasias melanocíticas orais e labiais, uma contagem mitótica de 4 ou mais foi associada a tempo de sobrevida mais curto em comparação com neoplasias com contagem mitótica menor (BERGMAN, 2007), no presente estudo, todas as neoplasias malignas tiveram um índice mitótico superior ao relatado pela literatura.

A pigmentação é difícil de quantificar histologicamente e há variação entre observadores, porém, independente disso, neoplasias melanocíticas cutâneas e orais/labiais altamente pigmentadas parecem apresentar tempos de sobrevida mais longos, e um ponto de corte igual ou superior a 50% das células pigmentadas tem sido associado a um melhor prognóstico (LAPRIE et al., 2001; SMEDLEY et al., 2011; BERGIN et al., 2011; SILVESTRE et al., 2018; PROUTEAU et al., 2020). Corroborando com a literatura descrita, através das análises de correlação, a variante com pouca pigmentação teve um maior índice de proliferação celular. Esse fato pode estar relacionado a um diagnóstico precoce quando o melanoma é fortemente pigmentado, visto que melanomas pouco ou não pigmentados podem mimetizar diversos tipos de neoplasias.

A fração de crescimento celular foi maior nos casos de melanomas cutâneos ulcerados. Segundo Laprie et al. (2001), neoplasias melanocíticas cutâneas ulceradas tendem a apresentar comportamento mais agressivo. Porém, não é um parâmetro independente, pois pode ser facilmente impactado por uma variedade de fatores externos, como traumas (SMEDLEY et al., 2011) o que observamos no trabalho, uma vez que a variável úlcera, sofria com a ação de *outliers* dentro da amostra.

Vários estudos demonstram que o índice Ki-67 prediz o prognóstico de neoplasias melanocíticas cutâneas e orais/labiais (LAPRIE et al., 2001; BERGIN et al., 2011; LACROUX et al., 2012; SMEDLEY et al., 2022; CAMERINO et al., 2022). Mais importante ainda, a veracidade do Ki-67, comparada a outros parâmetros histológicos, é menos afetada pela variabilidade interobservador. 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). A fração de crescimento determinada pelo Ki-67 deve ser considerada juntamente ao histórico clínico e demais características histopatológicas, uma vez que diferentes diagnósticos e localizações, com ou sem a presença de um elevado índice mitótico, por exemplo, apresentaram diferentes valores de Ki-67.

No melanoma cutâneo canino, 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). Neste estudo, há casos de

melanomas cutâneos com elevadas taxas de fração de crescimento, quando comparado a outros casos de cavidade oral que, na histopatologia, possuíam características de malignidade mais exacerbadas. O índice Ki-67 demonstrou prever o prognóstico de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas com mais precisão do que a contagem mitótica ou outros critérios histológicos (LAPRIE et al., 2001). Ao considerar essa informação, pode-se afirmar que nos melanomas cutâneos, a proteína Ki-67 deve ser utilizada em conjunto com outros parâmetros, como o índice mitótico, para assegurar uma análise precisa do tumor com base no potencial proliferativo.

Embora as neoplasias melanocíticas cutâneas tenham uma tendência a serem menos agressivas do que suas contrapartes orais e sejam frequentemente curadas por excisão cirúrgica, tumores melanocíticos cutâneos altamente malignos e orais de baixa malignidade ocorrem com alguma frequência (BERGMAN, 2007; SMEDLEY et al., 2022) por isso, prognóstico preciso, através de análises para além da histopatologia, é essencial para uma intervenção terapêutica bem-sucedida.

A invasão vascular sanguínea ou linfática é um forte indicador prognóstico de comportamento maligno para neoplasias melanocíticas cutâneas e orais/labiais (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Observamos metástases para linfonodos em 18 casos, destes, 11 possuíam elevada fração de crescimento celular, seis eram provenientes de cavidade oral e cinco, de pele e em oito linfonodos metastáticos, havia elevada marcação de macrófagos associados a tumores. Segundo estudos realizados por Hahn et al. (1994) e Proulx et al., (2003), ao contrário da metástase à distância, as observadas nos linfonodos regionais têm pouco ou nenhum valor prognóstico para a duração da remissão, ou tempo de sobrevivência para cães com melanomas orais. A evidência de metástase visceral está associada a um prognóstico desfavorável para neoplasias melanocíticas caninas de qualquer localização. Estudos adicionais que incluem neoplasias melanocíticas benignas e malignas de vários sítios anatômicos são necessários para tirar conclusões definitivas em relação à metástase linfonodal como fator prognóstico (SMEDLEY et al., 2011). Além das metástases para os linfonodos regionais, outros seis casos tinham metástases para pulmão e outros órgãos, como baço, rins e encéfalo. Nestes, foi observado, que o índice de Ki-67 e os TAMs, também possuíam elevada imunorreatividade. As metástases a longa distância comprometem ainda mais o prognóstico do animal. É difícil correlacionar metástases a longas distâncias com o prognóstico, devido ao escasso número de casos em que essa estava presente. Todavia, nos casos onde se sabe da presença de metástases viscerais, foi observado elevada fração de crescimento celular pelo Ki-67.

Segundo Millanta et al. (2002), a espessura do tumor, a inflamação e a necrose não estão significativamente relacionadas ao índice de Ki-67. Verificou-se que a fração de crescimento mostrou maior correlação com úlcera presente nos casos cutâneos e necrose presente nos casos de melanomas de cavidade oral. A espessura da neoplasia não pode ser avaliada por se tratar de um estudo retrospectivo em sua maior parte. Assim como o Ki-67 também se relaciona com o índice mitótico (SMEDLEY et al., 2011), que também foi possível observar em parte dos casos deste estudo, principalmente os de cavidade oral com alta índice mitótico. Já com relação à presença ou ausência de pigmento, segundo descrito por Smedley et al., (2011), existe uma correlação inversa, ou seja, quanto menos pigmento, maior tende a ser a fração de crescimento celular, o que também encontramos em nossos resultados. Já achados como a presença de hemorragia, não mostraram relação com a fração e crescimento celular.

E, ao contrário do observado por Millanta et al., (2002), neste estudo, o índice de Ki-67 relacionou-se melhor com os melanomas cutâneos do que com aqueles da cavidade oral. O índice Ki-67 demonstrou prever com maior precisão o prognóstico de

neoplasias melanocíticas orais caninas do que a contagem mitótica ou a atipia nuclear (BERGIN et al., 2011). Na literatura, as características histopatológicas dos melanomas de cavidade oral, são bastante conhecidas e discutidas, indicando que essa localização, tem um mau prognóstico. No entanto, nas análises imuno-histoquímicas realizadas por Bergin et al., (2011), e também observado neste estudo, alguns melanomas de cavidade oral, apesar de ter características histopatológicas de malignidade, não apresentam elevada fração de crescimento como esperado. O que pode sugerir que apenas características anatômicas e histopatológicas, quando observadas de maneira isolada, não são boas para predizer um prognóstico.

Na maioria dos pacientes com melanoma, a sobrevida clínica é reduzida devido às metástases de tumores avançados. Por isso, é de extrema importância compreendermos as características celulares e moleculares do microambiente tumoral para explorar novos alvos terapêuticos. Em alguns tumores humanos, há associação entre TAMs, progressão neoplásica e metástase (GWAK et al., 2015), no entanto, há pouca informação disponível sobre cães. Macrófagos associados a tumores indicam supressão imunológica, que promove a tumorigênese (HUANG et al., 2020). As contagens de macrófagos são diferentes entre neoplasias benignas e neoplasias malignas e também dependendo da localização desta, como observado no nosso trabalho. Na tumorigênese em estágio inicial, macrófagos são visualizados em pontos de ruptura da membrana basal durante a neoplasia maligna (CONDEELIS e POLLARD, 2006). Essas características sugerem que os tumores exploram as capacidades normais de remodelação da matriz macrófagos, permitindo-lhes sair e migrar através do estroma circundante (POLLARD, 2004; WYCKOFF et al., 2004; LIN et al., 2006). Na maioria dos casos observados, os macrófagos CD206+, encontravam-se no estroma da neoplasia ou em tecido adjacente.

Estudos clínicos em seres humanos e em modelos animais sugerem que os TAMs são tipicamente polarizados dentro do microambiente tumoral e podem adotar um fenótipo particular para desempenhar funções que dão suporte à infiltração, motilidade e invasão vascular das células tumorais (BISWAS et al., 2013; NOY e POLLARD, 2014). Em melanomas malignos, observamos um perfil de CD206+, onde os macrófagos eram mais abundantes, indicando uma infiltração polarizada por M2.

Estudos realizados por Huang et al., (2020), em humanos, revelaram que em tecidos de pele saudáveis, foi observado uma expressão baixa de macrófagos M2, enquanto, nos tecidos de melanoma, havia uma alta expressão para CD206. No presente estudo, dos 21 casos com maior expressão de CD206, 16 tiveram elevada infiltração por macrófagos M2 (cinco melanomas de cavidade oral, sete melanomas cutâneos e quatro melanocitomas de pele).

Para melanomas com metástases em linfonodos, as células imunes que infiltram o tumor são particularmente complexas (KLAPPERICH et al., 2019). Os linfonodos são ricos em linfócitos CD3 e CD20, tornando a definição da pontuação imunológica muito mais difícil (MOZZILLO et al., 2013). De fato, a pontuação para metástases de linfonodos em pacientes requer uma padronização ainda não descrita, mas foi possível destacar que, nas metástases também havia elevada infiltração por macrófagos M2, o que corrobora com estudos feitos por Leignadier et al., (2016) e Ballas et al., (2013), onde foi constatado que as células imunes infiltrantes nos tumores estão associadas à supressão tumoral, imunossupressão e metástases.

Os TAMs interagem com outras células imunes intratumorais, como células dendríticas, neutrófilos e com um papel fundamental no controle do ambiente imunossupressor do melanoma e na promoção da transformação neoplásica, proliferação e capacidade invasiva dos melanócitos (NEAGU, 2012; TOH et al., 2013).

Além disso, uma comunicação direta entre TAMs e células neoplásicas foi sugerida recentemente (WANG et al., 2012). Essas comunicações intercelulares promovem a invasão local e a disseminação metastática do melanoma por meio da secreção de moléculas como fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β (BOECKE et al., 2013), interferon- γ (ZAIDI et al., 2011), uPAR, fator de crescimento endotelial vascular- C e metaloproteinase de matriz-9, que melhoram o crescimento e a motilidade das células tumorais, bem como a angiogênese (BOZDOGAN et al., 2010; YADDANAPUDI et al., 2013). Visto isso, podemos constatar que os TAMs, correlacionam-se com a progressão do melanoma e um pior prognóstico, como descrito ZHOU et al., (2022), que esses macrófagos tendem a polarizar para um fenótipo M2 (CD163⁺/CD206⁺/CD204⁺), que, promove imunossupressão (IL-10, TGF- β , PD-L1), angiogênese (VEGF) e remodelamento de matriz (MMPs), correlacionando-se com progressão tumoral, metástase e pior prognóstico em melanoma humano e canino.

Embora o CD206 seja tradicionalmente utilizado como marcador de macrófagos M2, associado à imunossupressão e progressão tumoral, sua expressão não é restrita a neoplasias malignas. Estudos demonstram que macrófagos CD206 participam de funções fisiológicas de homeostase tecidual, fagocitose de detritos celulares e processos de reparo, estando presentes inclusive em tecidos não neoplásicos (MANTOVANI et al., 2022). No contexto de melanocitomas caninos, lesões benignas podem apresentar infiltrado inflamatório significativo, com presença de macrófagos CD206⁺. Essa infiltração pode refletir resposta inflamatória crônica tumoral (RODRIGUEZ et al., 2018), atividade de limpeza celular (especialmente quando há necrose, hemorragia ou ulceração) (PORCELLATO et al., 2022) e remodelamento da matriz extracelular, processo fisiológico mediado por macrófagos M2 (MILLS, 2012). Dados que podem explicar o porquê de encontrarmos elevada infiltração de macrófagos CD206 nos melanocitomas caninos deste estudo. Essa observação reforça a importância de interpretar o CD206 em conjunto com outros parâmetros histológicos e clínicos, a fim de distinguir adequadamente os efeitos associados à benignidade daqueles vinculados à malignidade.

Por sua vez, no melanoma canino, estudos com IHQ (CD163, CD204, Iba1, MAC387) mostram maior infiltração por macrófagos M2 em tumores malignos, associação com índice mitótico e relação com metástase (PORCELLATO et al., 2022; MOELLER et al., 2023). Observamos de fato que, a infiltração de macrófagos M2 nos melanomas, correlacionou-se bem com progressão da neoplasia e com as metástases, uma vez que valores mais elevados de CD206 estão levemente associados a maiores valores de Ki-67 (tanto nos melanomas cutâneos, quanto nos da cavidade oral), principalmente nos linfonodos. Essa associação indica que a progressão do melanoma não depende apenas da capacidade proliferativa das células tumorais, mas também da modulação do estroma imune que sustenta esse crescimento. Tal perfil pode caracterizar melanomas com pior prognóstico, justificando maior vigilância clínica e a busca por terapias direcionadas ao microambiente tumoral.

6. CONCLUSÕES

Os valores de Ki-67 e de CD206 foram mais elevados nos melanomas cutâneos, e são bons indicativos do prognóstico para essa localização, quando associados aos dados clínico-patológicos.

Melanomas são neoplasias altamente metastáticas e variante com pouca pigmentação, tem maior índice de proliferação celular. Linfonodos metastáticos têm elevados valores de Ki-67 e grande infiltração de macrófagos M2.

Há uma correlação entre a infiltração por macrófagos associados a tumores e a fração de crescimento celular tanto nos melanomas orais e cutâneos, como nas metástases nodais.

Elevados níveis de CD206 em melanomas caninos indicam maior infiltração de macrófagos M2, cuja atividade imunossupressora e pró-angiogênica favorece a progressão tumoral. A presença dos macrófagos CD206+ podem indicar uma alteração na resposta imune ao tumor ou uma forma de escape tumoral, entretanto, não parece ser um marcador melhor ou que colabore significativamente com relação ao prognóstico se utilizado de maneira isolada.

A associação concomitante de macrófagos associados a tumores e a elevada fração de crescimento tumoral (Ki-67), sugere uma interação entre o microambiente tumoral permissivo e proliferação neoplásica acelerada, caracterizando um perfil de maior agressividade biológica e pior prognóstico clínico. Esses achados reforçam a importância de considerar tanto a proliferação celular quanto o fenótipo imune associado ao tumor em análises prognósticas e no delineamento de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ATHERTON, M. J. et al. Cancer immunology and canine malignant melanoma: a comparative review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 169, p. 15–26, 2016.
- BABA, A. I.; CÂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: Publishing House of the Romanian Academy, 2007.
- BALLAS, Z. K. et al. Role of NK cell subsets in organ-specific murine melanoma metastasis. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e65599, 2013.
- BARROS, C. S. L. **Guia da técnica de necropsia dos mamíferos domésticos**. Santa Maria: [s.n.], 1998.
- 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. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007.
- 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.; SELMIC, L. E.; KENT, M. S. Melanoma. In: VAIL, D. M.; THAM, D. H.; LIPTAK, J. M. (ed.). **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2019. p. 367-381.
- BILLINGS, S. D. Tumor and tumor-like conditions of the skin. In: GOLDBLUM, J. R.; LAMPS, L. W.; MCKENNEY, J. K.; MYERS, J. L. (ed.). **Rosai and Ackerman's surgical pathology**. 11. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 45–143.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, p. 889, 2010.
- BISWAS, S. K.; ALLAVENA, P.; MANTOVANI, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. **Seminars in Immunopathology**, v. 35, p. 585–600, 2013.
- BOECKE, A. et al. TNF-1 receptor adapter protein FAN mediates TNF-induced B16 melanoma motility and invasion. **British Journal of Cancer**, v. 109, p. 422–432, 2013.
- BOZDOGAN, N. et al. **FAS, FAS ligand, tumor infiltrating lymphocytes, and macrophages in malignant melanoma: an immunohistochemical study**. [S.l.]: [s.n.], 2010.

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.

BRONKHORST, I. H. G. et al. Detection of M2-macrophages in uveal melanoma and relation with survival. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 52, n. 2, p. 643–650, 2011.

BROWN, C. C.; BAKER, D. C.; BARKER, I. K. Alimentary system. In: MAXIE, G. (ed.). **Pathology of domestic animals**. 5. ed. v. 1. Philadelphia: Elsevier, 2007. p. 1-296.

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.

CAMERINO, M. et al. Prognostic impact of bone invasion in canine oral malignant melanoma treated by surgery and anti-CSPG4 vaccination: a retrospective study on 68 cases (2010–2020). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 20, p. 189–197, 2022.

CARVALHO, N. S. et al. **Aspectos anatomopatológicos e avaliação da fração de crescimento (Ki-67) das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em cães no setor de anatomia patológica da UFRRJ (1999-2020)**. [S.l.]: [s.n.], 2021.

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

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263-266, 2006.

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. 386-397, 2008.

COWELL, R. L.; VALENCIANO, A. C. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 4. ed. Missouri: Elsevier, 2014. p. 32-34.

DE NARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer: balancing immune response crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, p. 1-10, 2007.

DOBSON, J. M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

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.

DUMMER, W. et al. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 5, n. 1, p. 67–68, 1995.

DUNCAN, L. M. et al. Low-CSD melanoma (superficial spreading melanoma). In: ELDER, D. E. et al. (ed.). **WHO classification of skin tumors**. 4. ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, 2018. p. 76-77.

ELDER, D. E. et al. **WHO classification of skin tumours**. Lyon: IARC/WHO, 2018.

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.

FUJIMURA, T.; AIBA, S. Significance of immunosuppressive cells as a target for immunotherapies in melanoma and non-melanoma skin cancers. **Biomolecules**, v. 10, n. 8, p. 1087, 2020.

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.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GERLINI, G. et al. Metastatic melanoma secreted IL-10 down-regulates CD1 molecules on dendritic cells in metastatic tumor lesions. **American Journal of Pathology**, v. 165, n. 6, p. 1853–1863, 2004.

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.

GOLA, C. et al. Hypoxia-associated markers in the prognosis of oral canine melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 61, n. 5, p. 721-731, 2024.

GOLDSCHMIDT, M. H.; GOLDSCHMIDT, K. H. Epithelial and melanocytic tumors of the skin. In: MEUTEN, D. J. (ed.). **Tumors in domestic animals**. 5. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2020. p. 123-131.

GROSS, T. L. et al. **Doenças de pele do cão e do gato: diagnóstico clínico e histopatológico**. 2. ed. [S.l.]: [s.n.], 2009.

GRANDI, F.; RONDELLI, M. C. H. Neoplasias cutâneas. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B. de. (ed.). **Oncologia em cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2016. p. 339-360.

GWAK, J. M. et al. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. e0125728, 2015.

HASSAN, B. B. et al. Cutaneous tumors in dogs: a retrospective epidemiological and histological study of 112 cases. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 10, n. 1, p. 170-182, 2022.

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

HAUCK, M. L. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. (ed.). **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 5. ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, cap. 18, p. 389-393, 2013..

HUANG, L. et al. Correlation of tumor-infiltrating immune cells of melanoma with overall survival by immunogenomic analysis. **Cancer Medicine**, v. 9, n. 22, p. 8444-8456, 2020.

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.

IUSSICH, S. et al. PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 15, p. 462–469, 2017.

ITAKURA, E. et al. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. **Modern Pathology**, v. 24, n. 6, p. 801–809, 2011.

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

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

KLAPPERICH, M. E.; BOWEN, G. M.; GROSSMAN, D. Current controversies in early-stage melanoma: questions on management and surveillance. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 15-25, 2019.

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.

LACROUX, C. et al. Study of canine cutaneous melanocytic tumours: evaluation of histological and immunohistochemical prognostic criteria in 65 cases. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, p. 393–401, 2012.

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.

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

LEE, J. H. et al. Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 1, p. 107–112, 2005.

LEIGNADIER, J. et al. CD8 engineered cytotoxic T cells reprogram melanoma tumor environment. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 3, p. e1086861, 2016.

LIN, E. Y. et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. **Cancer Research**, v. 66, p. 11238-11246, 2006.

MANTOVANI, A. et al. Macrophages in cancer: tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, p. 1-25, 2022.

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

MEUTEN, D. J. (ed.). **Tumors in domestic animals**. 5. ed. Ames: 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.

MILLS, C. D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v. 32, n. 6, p. 463-488, 2012.

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.

MOELLER, A. et al. Challenges and prospects of CSF1R targeting for advanced malignancies. **American Journal of Cancer Research**, v. 13, n. 7, p. 3257, 2023.

MONTEIRO, L. N. et al. Tumour-associated macrophages: relation with progression and invasiveness, and assessment of M1/M2 macrophages in canine mammary tumours. **Veterinary Journal**, v. 234, p. 119-125, 2018.

MOZZILLO, N. et al. Superficial and deep lymph node dissection for stage III cutaneous melanoma: clinical outcome and prognostic factors. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2015.

NAKAGAWA, T. et al. Mitotic index is the most powerful prognostic factor in patients with primary cutaneous malignant melanoma. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 2, p. 214-219, 2011.

NAKAMURA, Y. et al. Inhibition of IL-10 signaling enhances the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in melanoma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 2, p. 904–914, 2020.

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

O'BRIEN, M. G. et al. Treatment of oral malignant melanoma in dogs by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 36, n. 4, p. 293-296, 1995.

- OLIVEIRA, F. N. et al. Oral melanoma in dogs: retrospective study of 32 cases (2002–2014). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 7, p. 669-673, 2016.
- OLIVEIRA, G. R. et al. Oral melanoma in dogs: epidemiological study and prognostic factors. **Ciência Rural**, v. 51, n. 12, 2021.
- OTTNIN, R. C. et al. Histopathology of preclinical mouse models of prostate cancer: applications to drug development. **Toxicologic Pathology**, v. 45, n. 4, p. 456-470, 2017.
- PAOLONI, M. C. et al. Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. **BMC Genomics**, v. 10, p. 625, 2009.
- PAVAN, T. L. et al. Canine melanoma: immunohistochemical expression of CD3, CD20, CD79a, and MUM1. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 59, p. e184582, 2022.
- PHILLIPS, B. S. et al. Histopathological and immunohistochemical assessment of melanocytic neoplasms in gray horses. **Veterinary Pathology**, v. 56, n. 2, p. 221–228, 2019.
- PLATT, S. R. et al. Neurological signs caused by a trigeminal malignant melanoma in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 444–448, 1997.
- PORCELLATO, I. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes in canine melanocytic tumours: an investigation on the prognostic role of CD3+ and CD20+ lymphocytic populations. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 17, n. 3, p. 311-319, 2019.
- QUEIROGA, F. L.; PINTO, C.; PEREIRA, C. Oral and cutaneous melanocytic tumours in the dog: a clinical, pathological, and immunohistochemical study. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 52, n. 7, p. 345–351, 2005.
- 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.
- REBHUN, R. B.; THAMM, D. H. Biology and treatment of canine osteosarcoma. **Veterinary Surgery**, v. 39, n. 1, p. 102-107, 2010.
- REIS, L. F. L. **Oncogenômica: do câncer à medicina de precisão**. São Paulo: Atheneu, 2016.
- RICHARDS, H. G. et al. Central nervous system metastases in malignant melanoma: correlation with ki67. **Journal of Clinical Pathology**, v. 39, n. 8, p. 822-826, 1986.
- RITT, M. G. et al. Immunohistochemical detection of p53 and p21/waf-1 in canine malignant melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 146-153, 2000.
- RODRIGUES, A. M. et al. Diagnóstico histopatológico de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas: estudo de 34 casos. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1359-1365, 2008.
- RODRIGUEZ, F. J. et al. Canine gliomas: a comparative study. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 4, p. 561-579, 2012.

RUNGHI, R. et al. Macrophages, their modulation and the potential use of RNA interference in their reprogramming strategy: a review. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 15, p. 6-21, 2017.

SARLI, G. et al. Cell proliferation in canine and feline melanocytic neoplasms: relationship with histological parameters and clinical behavior. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 65-72, 2002.

SCARPA, F. et al. A new predictive score for dogs with oral melanoma: results from a multicenter study. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1688, 2020.

SCARPA, F. et al. Prognostic value of Ki67 and MCM7 expression in canine oral melanomas. **Veterinary Journal**, v. 215, p. 18-24, 2016.

SELVARAJAN, S. et al. Distribution of cell cycle regulatory proteins in canine melanocytic tumors: associations with proliferation and clinicopathological variables. **Veterinary Journal**, v. 196, p. 208-216, 2013.

SERRA, M. et al. Evaluation of Ki67 and PCNA expression in canine melanocytic tumors. **Veterinary Pathology**, v. 48, p. 132-137, 2011.

SHENG, J. et al. The efficacy of cancer immunotherapy is negatively regulated by Foxp3⁺ regulatory T cells in murine melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 3, p. 682-688, 2018.

SINGH, S. K. et al. Natural killer T cell-targeted immunotherapy mediates melanoma regression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 8, p. 1211-1220, 2003.

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.

SMEDLEY, Rebecca C.; SEBASTIAN, Kimberley; KIUPEL, Matti. Diagnosis and prognosis of canine melanocytic neoplasms. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 4, p. 175, 2022.

SMEDLEY, Rebecca C. et al. Diagnosis and histopathologic prognostication of canine melanocytic neoplasms: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 20, n. 4, p. 739-751, 2022.

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

SOARES, N. P. et al. Distribuição de neoplasias melanocíticas em cães diagnosticadas em hospital veterinário no Ceará. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 15, n. 1, p. 16-27, 2021.

SPINOLA, G. et al. Cutaneous melanoma in dogs: a retrospective analysis of 65 cases (2011-2016). **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 19, n. 2, p. 63-70, 2021.

- STERMAN, D. et al. Mesenchymal stem cells can serve as tumor stroma. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1803-1810, 2007.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2. ed. Iowa: Blackwell, 2008.
- STRAHL, O. et al. Tumor-associated macrophages in canine malignant melanoma: correlation with histopathological and clinical parameters. **Veterinary Pathology**, v. 63, n. 1, p. 123-134, 2026.
- SUZUKI, Y. et al. Early lung cancer diagnosis by means of small pulmonary nodules detection in computer tomography images. **Cancer**, v. 89, n. 11, p. 2444-2451, 2000.
- TARONE, L. et al. CSPG4-specific immunity and survival prolongation in dogs with oral malignant melanoma immunized with human CSPG4 DNA. **Clinical Cancer Research**, v. 25, n. 9, p. 2826-2835, 2019.
- TARDITO, S. et al. Macrophage M1/M2 polarization and rapamycin-induced immunosuppression. **International Journal of Oncology**, v. 40, p. 935-944, 2012.
- TURAN, T. et al. Tumor-associated macrophages in cutaneous melanoma: histopathological markers for prognosis. **Pathology**, v. 52, p. 584-590, 2020.
- VAIL, D. M.; THAMM, D. H.; LIPTAK, J. M. (ed.). **Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2019.
- VAN HERWAARDEN, A. E. et al. Intratumoral localization of myeloid-derived suppressor cells in human melanoma. **Human Pathology**, v. 50, p. 43-49, 2016.
- VAN HERWAARDEN, A. E. et al. Myeloid-derived suppressor cells in immune responses during melanoma progression. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 7, p. e1338996, 2017.
- VERDEGAAL, E. M. et al. Functional CD8⁺ T cells infiltrate into nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7565-7573, 2007.
- WOLCHOK, J. D. et al. Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 23, p. 7412-7420, 2009.
- WOLCHOK, J. D. et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 4, p. 311-319, 2015.
- WU, A. et al. Expression of MHC I and II and PD-L1 in primary canine oral malignant melanoma and lymph node metastases. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 3, p. 330-340, 2020.
- XIN, W. et al. Diagnostic immunohistochemistry of common and selected rare neoplasms encountered in bone and soft tissue pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 138, n. 12, p. 1564-1591, 2014.

ZHANG, Q. W. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PloS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, 2012.