



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CORRELAÇÃO DA
EXPRESSÃO DO MiTF E p38^{MAPK} COM FATORES PROGNÓSTICOS NOS
MELANOMAS CANINOS.**

CARLOS HUMBERTO DA COSTA VIEIRA FILHO

Médico Veterinário

Salvador – BA

2019

CARLOS HUMBERTO DA COSTA VIEIRA FILHO

**CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E CORRELAÇÃO DA
EXPRESSÃO DO MiTF e p38^{MAPK} COM FATORES PROGNÓSTICOS NOS
MELANOMAS CANINOS**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Saúde Animal

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima

Co-orientadores: Prof. Dr. Enio Ferreira (ICB/UFMG)

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (FO/UFBA)

SALVADOR – BA

MARÇO/2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V657c da Costa Vieira Filho, Carlos Humberto
CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E
CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DO MITF e p38MAPK COM FATORES
PROGNÓSTICOS NOS MELANOMAS CANINOS / Carlos Humberto
da Costa Vieira Filho. -- Salvador, 2019.
83 f. : il

Orientadora: Alessandra Estrela da Silva Lima.
Coorientador: Jean Nunes dos Santos/**Enio Ferreira**.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal nos Trópicos) -- Universidade Federal
da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia,
2019.

1. melanoma. 2. cães. 3. linfócitos. 4.
microambiente tumoral. 5. neoplasias melanocíticas. I.
Estrela da Silva Lima, Alessandra. II. Nunes dos
Santos, Jean. III. Título.

CDU:614.9

Caracterização da resposta inflamatória e correlação da expressão do MiTF e da p38^{MAPK} com fatores prognósticos nos melanomas caninos

Carlos Humberto da Costa Vieira Filho

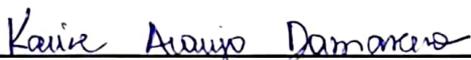
Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, em 25 de março de 2019

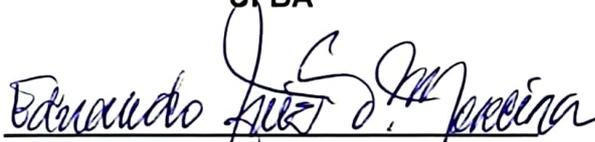
Comissão Examinadora:



Dr. Geovanni Dantas Cassali
UFMG



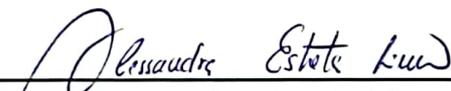
Dr. Karine Araújo Damasceno
UFBA



Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira
UFBA



Dr. Tiago da Cunha Peixoto
UFBA



Dr. Alessandra Estrela Lima
UFBA / Orientadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

CARLOS HUMBERTO DA COSTA VIEIRA FILHO – Nascido em 29 de novembro de 1985, na cidade de Salvador – BA. cursou toda a sua educação básica na Escola da Península (maternal ao terceiro ano do Ensino Médio), localizada no bairro da Ribeira-Salvador/BA. Iniciou sua graduação em Medicina Veterinária na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (EMEVZ-UFBA) no primeiro semestre do ano de 2005. Durante a graduação realizou estágios nos Laboratórios de Anatomia dos Animais Domésticos (2005) e Patologia Veterinária (2007 – 2010), bem como nas clínicas veterinárias de grandes (CDP) (2008-09) e pequenos animais (HOSPMEV) (2010). Enquanto estagiário no Laboratório de Patologia Veterinária, desenvolveu atividades de monitoria nas aulas das disciplinas Patologia Animal I (Geral) e II (Especial). Bolsista de Iniciação científica (PIBIC) em duas oportunidades (2007-08 e 2008-09) sob orientação do Prof. Dr. Eduardo Luiz Trindade Moreira e em uma oportunidade do Programa Permanecer como monitor da disciplina Fisiopatologia da Reprodução sob orientação do Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão (2010). Em 05 de agosto de 2010 obteve o título de Bacharel em Medicina Veterinária. No mês de março do ano de 2011 iniciou a Especialização sob a forma de residência no Hospital de Medicina Veterinária/UFBA no setor de Patologia Veterinária. Após aprovação em concurso público para Técnico-Administrativo da UFBA, se desligou do programa ao fim do mês de setembro de 2012. Desde outubro de 2012 presta serviços, na condição de patologista, no Laboratório particular de Patologia Veterinária (Histopathus). Realizou seleção para o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, onde obteve aprovação. Em março de 2015, teve sua dissertação de mestrado aprovada sob a orientação da Profa. Dra. Alessandra Estrela Lima. Neste mesmo ano, participou da seleção para o doutorado no referido programa, o qual obteve aprovação e começou a cursar o mesmo no mês de setembro. No ano de 2017 foi selecionado para o cargo de Professor Substituto das disciplinas Patologia Animal I e II, no Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias da EMEVZ-UFBA. Durante a graduação e a pós-graduação *lato-* e *stricto senso*, participou de eventos acadêmicos como ouvinte e/ou apresentando trabalhos sob a forma de resumos simples e expandidos; publicou trabalhos científicos em revista e periódicos; colaborou com projetos de diferentes áreas realizados no Laboratório de Patologia Veterinária; e orientou discentes de graduação inscritas no Programa Permanecer no Laboratório de Anatomia dos Animais Domésticos. Ao final do doutoramento, apresentou a qualificação no mês de novembro de 2018 e defesa em março de 2019.

Agradeço a minha família, minha mãe e meu pai (*in memoriam*), por me permitirem buscar meus sonhos e alcançar meus objetivos, e por me oferecerem apoio sempre.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proteger, me guiar durante todos esses anos.

A minha mãe, ao meu pai (*in memorian*), minha irmã e familiares por tudo, carinho, apoio e dedicação.

Ao meu avô Argone (*in memorian*) e minha avó Juracy (*in memorian*), que sei estar feliz por esta minha realização e me guiando da melhor forma possível.

Aos meus orientadores, pais e amigos durante esses 12 anos no Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV, Profa. Alessandra Estrela Lima e o Prof. Eduardo Luiz Trindade Moreira, que acreditaram em meu potencial e me proporcionaram a oportunidade de expandir meus conhecimentos e concluir mais esta etapa na minha vida.

A Suélen Reis, pelo carinho e compreensão durante todos esses anos em que estamos juntos.

A Dra. Karine Damasceno e as pós-graduandas do LAPEX/IGM pelo apoio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho, em especial a Carol.

Ao Prof. Tiago Peixoto, que apesar de pouco tempo de contato me passou muito conhecimento e sempre está a disposição para tirar dúvidas e discussões sobre casos interessantes.

Aos demais pós-graduandos do LPV (Laís Pereira, Marília Carneiro, Thanielle Novaes e Danielle Nascimento) que me ajudaram durante este período.

A todos os residentes que passaram ou estão no LPV por serem um estímulo para eu sempre estar me reciclando e estudando para melhor passar experiências a vocês.

Aos técnicos do LPV – Evanilda Conceição, Altemar Teixeira, Maria Williane, Zacarias (*in memorian*) e Washington Pedro pela disponibilidade para ajudar sempre que necessário nas atividades do laboratório.

Ao Prof. Aliomar Arlego Paraguassu (*in memorian*) pelo carinho e a atenção que sempre foi dispensada a mim.

Ao Laboratório de Patologia Veterinária Histopathus pela disponibilização dos casos utilizados na execução deste experimento.

A Emanuel Martins (Guga) pela paciência, disponibilidade e grande ajuda na realização das análises estatísticas.

Aos Professores Enio Ferreira e Jean Nunes pela co-orientação e auxílio para a realização das imuno-histoquímicas.

Ao pós-graduando Emerson Soares Veloso do LPC/ICB – UFMG pelo auxílio na realização e leitura das marcações imuno-histoquímicas.

Aos professores e funcionários do Setor de Anatomia Veterinária da EMEVZ/UFBA por entenderem a minha necessidade de realizar o doutorado.

A Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia que me deu condições para realização desse trabalho.

*“Faça uma lista de grandes amigos
Quem você mais via há dez anos atrás
Quantos você ainda vê todo dia
Quantos você já não encontra mais*

*Faça uma lista dos sonhos que tinha
Quantos você desistiu de sonhar
Quantos amores jurados pra sempre
Quantos você conseguiu preservar*

*Onde você ainda se reconhece
Na foto passada ou no espelho de agora
Hoje é do jeito que achou que seria?
Quantos amigos você jogou fora*

*Quantos mistérios que você sondava
Quantos você conseguiu entender
Quantos segredos que você guardava
Hoje são bobos ninguém quer saber*

*Quantas mentiras você condenava
Quantas você teve que cometer
Quantos defeitos sanados com o tempo
Eram o melhor que havia em você*

*Quantas canções que você não cantava
Hoje assobia pra sobreviver
Quantas pessoas que você amava
Hoje acredita que amam você.”*

A Lista, Oswaldo Montenegro (2001)

RESUMO

VIEIRA-FILHO, C.H.C. **Caracterização da resposta inflamatória e correlação da expressão do MiTF e p38^{MAPK} com fatores prognósticos nos melanomas caninos.** 2019. 84p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2019.

O infiltrado inflamatório linfocítico associado ao melanoma vem sendo estudado ao longo dos anos na medicina como possível fator prognóstico desse tumor altamente agressivo, porém esta avaliação ainda não é muito bem descrita nos melanomas caninos. Desta forma este estudo caracteriza a resposta inflamatória associada aos melanomas caninos nos diferentes sítios anatômicos (boca, dígito e pele) e verificar a expressão e correlação do MiTF e da p38^{MAPK} com fatores prognósticos e a sobrevida. Foram estudados 117 melanomas classificados com base na sua localização em dois grupos: melanomas localizados na cavidade oral/dígitos (n=74) e melanomas cutâneos (n=43), os quais foram submetidos à análise morfológica e morfométrica das células inflamatórias e avaliação clínico-patológica sistemática, além da avaliação da taxa de sobrevida e a população de linfócitos CD4⁺ e FoxP3⁺ nos tumores orais/dígitos. A partir desses parâmetros, foi observado que os tumores orais/dígitos estavam associados com características patológicas relacionadas ao pior prognóstico como o tamanho, índice mitótico, tipo histológico, atipia nuclear e a presença de metástase. A inflamação esteve mais presente nos tumores orais/dígitos, porém discreta, quando comparado ao grupo dos melanomas cutâneos, sendo os linfócitos o tipo celular predominante, com maior população de células CD4⁺ e FoxP3⁺ observada nos animais com maiores dimensões e maior expressão de MiTF. MiTF e p38^{MAPK} foi menos expressa nos melanomas orais / dígitos, em especial nos maiores de 2,0 cm, sem a presença do TIL e associadas a menor sobrevida. A análise multivariada mostrou que a presença do infiltrado linfocítico foi um fator prognóstico independente, tendo correlação com a taxa de sobrevida. A não expressão do MiTF e p38^{MAPK}, em conjunto com a maior população de linfócitos CD4⁺ e FoxP3⁺ foi associada aos melanomas da cavidade oral / dígito, fornecendo importantes ferramentas alternativas no estabelecimento de possíveis fatores prognósticos.

Palavras-chave: cães, linfócitos, neoplasia melanocítica, microambiente tumoral.

ABSTRACT

VIEIRA-FILHO, C.H.C. **Characterization of the inflammatory response and correlation of MiTF and p38^{MAPK} expression with prognostic factors in canine melanomas. 2019.** 84p. Tese (Doutor em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2019.

The inflammatory lymphocytic infiltrate associated with melanoma has been studied over the years in medicine as a possible prognostic factor for this highly aggressive tumor, but this evaluation is still not very well described in canine melanomas. Thus, this study characterizes the inflammatory response associated with canine melanomas in the different anatomical sites (mouth, digit and skin) and to verify the expression and correlation of MiTF and p38^{MAPK} with prognostic factors and survival. We studied 117 melanomas classified based on their location in two groups: melanomas located in the oral cavity / digits (n = 74) and cutaneous melanomas (n = 43), which were submitted to morphological and morphometric analysis of inflammatory cells and clinical evaluation and the population of CD4⁺ and FoxP3⁺ lymphocytes in oral tumors / digits. From these parameters, it was observed that oral tumors / digits were associated with pathological features related to the worst prognosis such as size, mitotic index, histological type, nuclear atypia and the presence of metastasis. The inflammation was more present in the oral / digits tumors, however discrete, when compared to the group of cutaneous melanomas, the lymphocytes being the predominant cell type, with a larger population of CD4⁺ cells and FoxP3⁺ observed in animals with larger dimensions and greater MiTF expression. MiTF and p38^{MAPK} was less expressed in oral melanomas / digits, especially in the larger 2.0 cm, without TIL and associated with lower survival. The multivariate analysis showed that the presence of lymphocytic infiltrate was an independent prognostic factor, correlating with the survival rate. The non-expression of MiTF and p38^{MAPK}, together with the larger population of CD4⁺ and FoxP3⁺ lymphocytes, was associated with oral cavity / digit melanomas, providing important alternative tools in establishing possible prognostic factors.

Keywords: dogs, lymphocytes, melanocytic neoplasia, tumor microenvironment.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Secções histológicas coradas com Fontana-Masson evidenciando (A) melanoma com grande quantidade de melanina evidenciada após marcação histoquímica - 40x. B) Destaque – células neoplásicas contendo no citoplasma grânulos de melanina - 400x.....	33
Figura 2	Fotomicrografias de melanoma canino coradas com HE exemplificando os critérios avaliados, como os diferentes graus de atipia nuclear – A) leve, B) moderada e C) intensa. D) Melanoma do tipo epitelióide com leve produção de melanina. E) Melanoma de células alongadas dispostas em ninhos, na sua maior contendo melanina. F) Melanoma com padrão histológico misto, células epitelióides e alongadas com leve produção de melanina - 400X.....	43
Figura 3	Fotomicrografia com infiltrado inflamatório associado ao melanoma – intenso infiltrado inflamatório intratumoral localmente extenso - 40x, constituído predominantemente por linfócitos - 400x (detalhe).....	45
Figura 4	Composição do infiltrado inflamatório associado aos melanomas caninos.....	45
Figura 5	Frequência do infiltrado linfocítico associado aos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores que 2cm.....	46
Figura 6	Expressão do MiTF nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	47
Figura 7	Comparação da expressão do MiTF nos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores de 2,0 cm localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	47
Figura 8	Comparação da expressão do MiTF nos melanomas caninos com diferentes índices mitóticos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	48
Figura 9	Associação entre a expressão do MiTF com a presença do TIL nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	48
Figura 10	Expressão da proteína p38 nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	49
Figura 11	Comparação da expressão do MiTF nos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores de 2,0 cm localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	49
Figura 12	Comparação da expressão do p38 nos melanomas caninos com diferentes índices mitóticos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	50
Figura 13	Associação entre a expressão da p38 com o TIL nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.....	50
Figura 14	Fotomicrografias de melanoma canino, reação imuno-histoquímica A) Imunomarcção nuclear (setas) em melanócitos neoplásicos para o anticorpo anti-MiTF – 400x. B) Imunomarcção citoplasmática em melanócitos neoplásicos para o anticorpo anti-p38 – 400x. C) Imunomarcção de linfócitos presentes no TIL associado ao melanoma para o anticorpo anti-CD4 ⁺ (setas) – 100x. D) Imunomarcção de linfócitos presentes no TIL associado ao melanoma para o anticorpo anti-FoxP3 ⁺ (setas) – 100x.....	51

Figura 15	Curvas de sobrevida estratificadas pela localização, tamanho tumoral independente da localização, presença do TIL nos tumores em cavidade oral /dígito e expressão de MiTF e p38.....	52
Figura 16	Cão com melanomas localizados primariamente na cavidade oral e pele. Lesões em gengiva do ramo mandibular direito (A) com superfície de corte enegrecida e metástase para linfonodo submandibular (setas) (B). Nódulos cutâneo (C) e subcutâneo (D). Focos de metástase neoplásica para costela (E), diafragma (F), fígado (G), próstata (H), rim (I), meninges (L), coração (M) e pulmão (N).....	56
Figura 17	Secções histológicas coradas em HE evidenciando (A) proliferação de melanócitos neoplásicos em cavidade oral, se estendendo as proximidades da glândula salivar, com focos de metástases para rim (B), próstata (C), pulmão (D) – 40X/40X/40X/100X.....	57
Figura 18	Secções histológicas coradas em HE evidenciando metástases de melanoma para diafragma (A), miocárdio (B), costela (C) e meninge (D) – 40X/100X/100X/100X.....	58

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Intervalo de intensidade dos tipos celulares inflamatórios no microambiente tumoral dos melanomas localizados na cavidade oral e dígitos.....	35
Tabela 2	Intervalo de intensidade dos tipos celulares inflamatórios no microambiente tumoral dos melanomas cutâneos.....	35
Tabela 3	Dados referentes aos anticorpos utilizados.....	36
Tabela 4	Frequência dos animais SRD e das raças de cães acometidos com melanoma oral/dígito diagnosticados em uma série de cinco anos (2012-2017).....	39
Tabela 5	Frequência dos animais SRD e das raças de cães acometidas com melanoma cutâneo diagnosticados em uma série de cinco anos (2012-2017).....	40
Tabela 6	Distribuição da frequência das características histológicas em 117 melanomas em cães.....	42
Tabela 7	Distribuição do infiltrado inflamatório nas neoplasias melanocíticas em cães.....	44
Tabela 8	Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nas neoplasias melanocíticas em cães.....	44
Tabela 9	Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos associados com a presença do TIL nos melanomas orais/dígitos em cães.....	54
Tabela 10	Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos associados com a presença do TIL nos melanomas cutâneos em cães.....	54
Tabela 11	Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos e o TIL associados com a sobrevida nos melanomas em cães.....	55

LISTA DE SIGLAS

α -MSH	Hormônio estimulante de melanócitos- α
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
CDK	Cinase dependente de ciclina
CD4	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares / indutores
CD8	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos / supressores
CETEA/CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal/Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CTLA-4	Antígeno de linfócito T citotóxico-4
DAB	3'3-diaminobenzidina
DCT	Tautomerase dopacrômica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EMEVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
EMT	Transição epitelial-mesenquimal
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FoxP3	Forkhead box P3
HE	Hematoxilina-Eosina
HOSPMEV	Hospital de Medicina Veterinária
IGM	Instituto Gonzalo Moniz
IL-10	Interleucina 10
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
L-DOPA	L-di-hidroxifenilalanina
LPC	Laboratório de Patologia Comparada
LPV	Laboratório de Patologia Veterinária
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
MiTF	Fator de transcrição associado à microftalmia
NK	Natural killers
SAHF	Focos de heterocromatina associados a senescência
TGF- β	Fator de crescimento transformados beta
TFE3	Fator de transcrição E3
TFEB	Fator de transcrição EB
TFEC	Fator de transcrição EC
TIL	Infiltrado linfocítico associado ao tumor
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
Treg	Células T reguladoras

TRP 1 e 2	Proteína relacionada à tirosinase 1 e 2
TYR	Tirosinase
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 MELANOMA.....	20
2.2 INFLAMAÇÃO <i>VERSUS</i> CÂNCER.....	22
2.3 CICLO CELULAR E PROGRESSÃO TUMORAL.....	26
2.3.1 Fator de Transcrição Associado à Microftalmia (MiTF).....	27
2.3.2 MAPK/p38.....	29
3 OBJETIVOS.....	31
4 HIPÓTESES.....	31
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
6 RESULTADOS.....	39
7 DISCUSSÃO.....	59
8 CONCLUSÕES.....	67
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
10 ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma das neoplasias cutâneas mais importantes (GROSS et al., 2009), diagnosticada em 3,4% dos casos na cidade de Salvador (MACHADO et al., 2018), e a neoplasia oral mais frequente em cães, principalmente em animais mais velhos, sem predisposição sexual ou racial (BERGMAN, 2007). Em humanos, a sua etiologia é atribuída, por vezes, a mutações herdadas em genes que regulam o ciclo celular ou a telomerase, mas, na grande maioria dos casos, adquirida e relacionada aos danos no DNA em áreas expostas ou não aos raios ultravioleta (UV) (LAZAR e MURPHY, 2016), sendo portanto, raro na cavidade oral (ALTEMANI e AMSTALDEN, 2006). Na veterinária sua etiopatogenia ainda não é compreendida, mas, aparentemente não possui relação com a exposição à radiação UV (GROSS et al., 2009).

Tal como em muitos outros tipos de câncer, a mortalidade está associada, principalmente, com a propagação metastática do tumor primário, o que envolve interações complexas entre as células tumorais e o sistema imunológico do paciente (GATA et al., 2017). Independentemente do tipo de neoplasia, o processo inflamatório tem sido incriminado como um componente crítico no microambiente tumoral, podendo retardar ou contribuir para a proliferação, sobrevivência e disseminação das células neoplásicas (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; EIRÓ e VIZOSO, 2012; SNYDER, 2009).

Os mecanismos creditados incluem o estímulo a invasão, a migração e ao desenvolvimento de metástases, a produção de citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos, que influenciam na expressão de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; EIRÓ e VIZOSO, 2012; ONO, 2008). Por outro lado, um efeito antitumoral também é atribuído, caracterizado pela ação da resposta imune inata mediada por células *natural killers* (células NK) ou resposta imune adquirida os linfócitos T, em especial, os T CD8⁺ (VISSER et al., 2006).

A influência das células inflamatórias no desenvolvimento neoplásico é estudada no melanoma em humanos e os infiltrados linfocíticos, considerados fator prognóstico independente (SINNAMON et al., 2018), estão relacionados a um melhor prognóstico nos tumores superficiais e/ou em estágio de regressão (CLARK et al., 1989; GATA et al., 2017; MIHM e MULÉ, 2015). Contudo, nos cães, apesar da frequência dos melanomas, o processo inflamatório associado ao tumor ainda não está bem caracterizado, bem como, a sua correlação com fatores prognósticos.

Buscando conhecer as vias de ativação das células do melanoma, alguns reguladores do ciclo celular são estudados em linhagens celulares de melanomas humanos (AGUIRRE-GHISO

et al., 2003) e de animais (BELLEI et al., 2010; NOGUCHI et al., 2014), em especial o fator de transcrição associado à microftalmia (MiTF) (AIDA et al., 2017; CHELI et al., 2012) e a p38 (AGUIRRE-GHISO et al., 2003; BELLEI et al., 2010).

O MiTF foi proposto como um promotor da carcinogênese em melanócitos por influenciar diversos processos celulares, regulando a proliferação, a sobrevivência, a motilidade, o estresse oxidativo e os mecanismos de reparo do DNA (HAQ e FISHER, 2011). Nos melanomas o MiTF atua como um maestro molecular, que em concentrações muito baixas leva a senescência celular, em níveis intermediários a altos acarreta o crescimento celular e em níveis muito elevados, promove a diferenciação celular e a interrupção do crescimento (PLOPER e De ROBERTIS, 2015). Em estudo realizado com ratos, a supressão da expressão do MiTF ocorre pela ativação da via p38, importante na inibição do crescimento celular (SHEN et al., 2012; SMALLEY e EISEN, 2000) e indução da senescência de células neoplásicas (ZHANG et al., 2013).

Ainda que se conheçam importantes fatores relacionados ao comportamento do melanoma (índice mitótico, metástases, tamanho do tumor, atíпия nuclear, pigmentação, inflamação e necrose), existem melanomas de comportamento biológico incerto. Portanto, justifica-se a realização de estudos adicionais sobre este tumor relativamente frequente, mas heterogêneo e agressivo quando localizado na cavidade oral, nas extremidades (acral) e região ungueal dos cães.

Ademais, tendo em vista a possibilidade de estudos comparativos entre os melanomas de cães e do homem (NOGUCHI et al., 2014), torna-se importante a realização de ensaios direcionados ao conhecimento e entendimento do microambiente tumoral e vias de sinalização, nesta espécie que é considerada como modelo pré-clínico para o melanoma não induzido pela radiação ultravioleta em humanos (HERNANDEZ et al., 2018). Neste contexto, objetivou-se caracterizar a resposta inflamatória associada aos melanomas caninos e sua atuação nos diferentes sítios anatômicos (boca, dígito e pele), avaliar a expressão e as correlações do MiTF e p38^{MAPK} com fatores prognósticos e sobrevida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MELANOMA

Os melanócitos são células de origem neuroectodérmica, embriologicamente derivadas da população germinativa dos melanoblastos, originários de células da crista neural, após o fechamento do tubo neural. Os quais, na maioria das espécies, começam o processo de melanização imediatamente antes ou logo depois de alcançar o seu destino (NORDLUND, 1986).

Os melanoblastos migram do tronco da crista neural até o seu destino na camada basal da epiderme ou no folículo piloso (ERICKSON, 1993). Melanoblastos derivados da crista neural também migram para o entorno do olho, mucosas, leptomeninges, pleura e a *stria vascularis* no ouvido interno. Diferenciando-se do neuroectoderma *in situ* para se tornar o epitélio pigmentar da retina (OLIVEIRA e JÚNIOR, 2003).

A síntese da melanina ou melanogênese é estimulada por uma gama de efetores, entre eles elevadores de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) como forskolina, isobutilmetilxantina e hormônio estimulante de melanócitos- α (α -MSH), a luz ultravioleta (UV) e lipopolissacarídeos (BELLEI et al., 2010). Nos mamíferos, a melanogênese envolve uma complexa via sintética contendo uma série de reações enzimáticas ou não, para a produção de dois tipos distintos de melanina: a feomelanina (avermelhada) ou a eumelanina (preto-acastanhada) (SIMON et al., 2009).

A melanogênese ocorre em um tipo de lisossomo, chamado de melanossomo (PARK et al., 2009), que contém três enzimas pigmentares principais, a tirosinase (TYR), a proteína relacionada a tirosinase-1 (TRP-1) e a tautomerase dopacrômica (DCT) ou proteína relacionada a tirosinase-2 (TRP-2) (BENEDITO et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1994; WINDER et al., 1994). O início da formação da melanina ocorre em duas etapas iniciais catalisadas pela tirosinase, com a oxidação da L-tirosina a L-di-hidroxfenilalanina (L-DOPA), e em sequência a dopaquinona. Este último metabólito, precursor comum para a feomelanina e a eumelanina (LAND et al., 2001). A feomelanina é formada e após o consumo da cisteína melanossômica, ocorre a produção da eumelanina (ITO e WAKAMATSU, 2007).

Depois de sintetizada e madura, os melanossomos são transportados por microtúbulos presentes nos dendritos dos melanócitos e transferidos para os queratinócitos (TADOKORO e TAKASHI, 2017), onde formam uma camada protetora sobre o núcleo para proteger o DNA do efeito nocivo da radiação ultravioleta (BOISSY, 2003). Em humanos, a maior proporção de feomelanina indica que ela pode ser um pró-oxidante fotossensibilizando o DNA a danos,

enquanto que a eumalanina atua como um antioxidante fotoprotetor (ITO e WAKAMATSU, 2007).

Apesar de serem morfológicamente idênticos nas diferentes espécies, os tumores melanogênicos apresentam diferentes incidências. Sendo mais comuns em cães e cavalos, e menos frequentes nas outras espécies (WEISS e FRESE, 1974). O melanoma é a neoplasia maligna de melanócitos e aparentemente não existe predisposição racial para o acometimento na espécie canina, mas o mesmo é principalmente observado em cães com pele e mucosas escuras (CAMPAGNE et al., 2013; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002). A maioria dos animais afetados estão na faixa etária entre sete e doze anos de idade (CAMARGO et al. 2008), mas também pode ser congênito ou afetar animais jovens (MEYRER et al., 2017).

Os sítios anatômicos mais frequentemente acometidos são, em ordem de maior para menor frequência: cavidade oral, lábios, pele, dígitos e olho (CAMPAGNE et al., 2013). A localização e o tamanho são os principais fatores determinantes para o seu comportamento biológico, sendo os tumores orais (gengiva da maxila, lábio, língua e palato) e/ou mucosa e da região dos dígitos considerados de forma rotineira como de elevado grau de malignidade (BERGIN et al., 2011; BERGMAN, 2007).

Macroscopicamente os melanomas se caracterizam por massas nodulares de superfície lisa ou irregular, com tamanho (milimétricos a grandes dimensões), consistência (elástica a firme) e coloração das superfícies externa e de corte variáveis (desde o branco a acinzentados nos tumores amelanóticos, ao negro naqueles muito pigmentados). Os orais apresentam comumente, áreas de necrose, ulceração e metástases principalmente para os linfonodos regionais e pulmões (GROSS et al., 2009; GUEDES et al., 2016), e com menor frequência coração, rim e encéfalo (RAMOS-VARA et al., 2000).

O diagnóstico do melanoma primário pode ser realizado a partir dos exames citológico e histopatológico, bem como a detecção de metástases em linfonodos sentinelas (PRZEZDZIECKI et al., 2015). Alguns fatores prognósticos negativos já foram descritos, a exemplo da presença de metástase, tamanho do tumor, atipia nuclear, pigmentação, índice mitótico, presença de células inflamatórias, necrose e ulceração (SMEDLEY et al., 2011; SPANGLER e KASS, 2006).

Na histopatologia os melanomas se apresentam como proliferações desencapsuladas de melanócitos que envolvem somente a derme com possível acometimento da epiderme (CLARK et al., 1969; GROSS et al., 2009). Compostos por células de diferentes fenótipos, variando de alongadas, redondas ou poligonais a dendríticas, epitelioides e balonosas, maiores que os melanócitos normais, com citoplasma escasso a abundante contendo variada quantidade de

melanina, núcleos grandes irregulares e nucléolos proeminentes (CLARK et al., 1969; GOLDSCHMIDT, 1985; WEISE e FRESE, 1974). Apesar destas diferenças fenotípicas, não foi determinada influência no prognóstico dos cães acometidos por melanomas (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017; GROSS et al., 2009; LAZAR e MURPHY, 2016).

Frente as diferentes características histológicas dos melanócitos neoplásicos, principalmente quando estes produzem pouco ou nenhuma melanina (tumores amelanóticos), podem mimetizar uma grande variedade de tumores, a exemplo dos linfomas, carcinomas pouco diferenciados, tumores neuroendócrinos, sarcomas e tumores de células germinativas (OHSIE et al., 2008; PATNAIK et al., 1986). Desta forma, a histoquímica com a coloração Fontana-Masson (BUSAM et al.; 2001) e a imuno-histoquímica vêm sendo utilizadas como alternativa para diferenciar os melanomas de outros tumores semelhantes a microscopia óptica em lâminas coradas em Hematoxilina-Eosina (OHSIE et al., 2008; PRIETO e SHEA, 2011).

Atualmente os marcadores imuno-histoquímicos mais utilizados para a identificação de uma neoplasia de origem melanocítica são a proteína S100, HMB45 e Melan-A (MART-1), entretanto, estes marcadores são incapazes de diferenciar de forma confiável as lesões benignas das malignas (KASHANI-SABET, 2014). O Ki-67 é um marcador que contribui na identificação do possível comportamento biológico dos melanomas, a partir da avaliação do índice proliferativo, que sabidamente terá uma maior expressão nos tumores de comportamento maligno (PRIETO e SHEA, 2011).

2.2 INFLAMAÇÃO *versus* CÂNCER

O sistema imune é formado por diferentes tipos celulares e uma complexa rede de sinais químicos capazes de responder a alterações na homeostase do organismo (ONO, 2008). Uma das suas funções primordiais é reconhecer e combater clones de células com alterações no DNA antes que formações neoplásicas se iniciem. Porém, tem-se demonstrado que essa efetividade antitumoral do sistema imune varia de acordo com o tipo tumoral envolvido e a capacidade da neoplasia em superar os mecanismos de defesa do organismo (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; COUSSENS e WERB, 2002).

O processo inflamatório tem sido aventado como um componente crítico no microambiente tumoral, pois pode retardar ou contribuir para a proliferação, sobrevivência e disseminação das células neoplásicas devido à produção de citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; EIRÓ e VIZOSO, 2012; HEYS et al., 2012). A influência das células inflamatórias no desenvolvimento neoplásico, tem sido relatada

em estudos com neoplasias mamárias em mulheres e cadelas (ESTRELA-LIMA et al., 2010; ESTRELA-LIMA et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2016; KIM et al., 2012; HEYS et al., 2012; TAN et al., 2011; VIEIRA-FILHO et al., 2018), tumores sólidos de pulmão em ratos, melanoma, tumores colorretais e mesotelioma em humanos (COUSSENS e WERB, 2002; ERRENI et al., 2011).

Fortes associações têm sido encontradas entre a inflamação crônica, constituída principalmente por linfócitos e macrófagos, e o desenvolvimento de câncer em humanos, a exemplo da relação entre as neoplasias malignas do cólon e a colite ulcerativa crônica; paratuberculose e a esquistossomose; o carcinoma hepato-celular e a infecção pelo vírus da hepatite C, e os carcinomas gástricos com o *Helicobacter pylori*. No entanto, o recrutamento destas células inflamatórias também podem representar uma resposta por parte do hospedeiro contra a neoplasia (COUSSENS e WERB, 2002; EIRÓ e VIZOSO, 2012).

As células inflamatórias recrutadas para o microambiente tumoral podem expressar fatores estimuladores a carcinogênese, bem como citocinas inflamatórias (TNF- α) e quimiocinas, que estimulam a quimiotaxia de células inflamatórias, resultando num “ciclo vicioso” de infiltração (BEN-BARUCH, 2003). Aparentemente, o tipo de células inflamatórias, a intensidade do infiltrado e o momento do início da resposta inflamatória são fatores que definem se a inflamação atuará como promotor ou inibidor do desenvolvimento tumoral (BLANKENSTEIN, 2004; ESTRELA-LIMA et al., 2010).

Em determinadas situações, as células responsáveis pela modulação da resposta inflamatória liberam fatores, tanto autócrinos como parácrinos, que estimulam a proliferação celular, inibem a apoptose e induzem a angiogênese (COUSSENS e WERB, 2002; MARX, 2004; STEWART e HEPPNER, 1997). Esses fatores associados podem acelerar a mutagênese e promover a sobrevivência de clones atípicos com maior capacidade de disseminação por via linfática ou hematogênica (THUN et al., 2004).

As imunidades inata e adaptativa possuem relação interdependente e interativa que mantém a homeostase do organismo, os linfócitos da resposta adaptativa além auxiliar a resposta inata em curso, sob certas circunstâncias agem como reguladores negativos da mesma (ZHAO et al., 2009). A imunologia tumoral é focada principalmente nas células T CD8⁺ devido à sua capacidade de destruição das células neoplásicas por ação direta e a forte associação entre a sua presença e a sobrevida de pacientes em muitos tipos de tumores (ERDAG et al., 2012; ESTRELA-LIMA et al., 2010; PAGÈS et al., 2010). Enquanto a ação das células B ainda é controverso, com função de inibir ou estimular a regressão dos tumores incitada pelas células T, mas, a depender do seu estado de ativação destas últimas (NELSON, 2010).

Nos tumores mamários o microambiente tumoral é infiltrado por uma população heterogênea de células inflamatórias, composta por linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares, em especial, os neutrófilos quando o tumor apresenta área de ulceração e necrose. Estudos realizados em cadelas e mulheres revelam ser os linfócitos o tipo celular predominante nos infiltrados inflamatórios associados aos carcinomas mamários, com células T CD4⁺ (T auxiliares) correlacionadas ao desenvolvimento de metástases e pior sobrevida (ESTRELA-LIMA et al., 2010; RUFFELL et al., 2012; TAN et al., 2011).

Os linfócitos T reguladores (Treg) integram o subconjunto de células T CD4⁺ geradas no timo e órgãos linfoides periféricos, com a função de suprimir respostas imunológicas e manter a autotolerância ao induzir a ativação de outras células T produzindo IL-10 e TGF- β ou inibir a habilidade de estimulação das células apresentadoras de antígenos, mecanismo este dependente do antígeno de linfócito T citotóxico-4 (CTLA-4) expresso por células T CD4⁺ FoxP3⁺ (*forkhead box P3*) (ABBAS et al., 2012; RALAINIRINA et al., 2007). As células T CD4⁺FoxP3⁺ são importantes no desenvolvimento e na manutenção da população das células Treg (STEINBERG et al., 2012).

As células Treg CD4⁺ de ocorrência natural que expressam o fator FoxP3 são indispensáveis para a manutenção da autotolerância imunológica e homeostase (SAKAGUCHI et al., 2010), divididas em três subpopulações pelos níveis de expressão deste fator e das moléculas de superfície CD25⁺ e CD45RA, com características altamente supressivas que diferenciam células T *naive* em reguladoras ou que secretam citocinas pró-inflamatórias não supressivas (MIYARA et al., 2009).

As células neoplásicas induzem a formação das células Treg periféricas suprimindo de forma eficiente a sua eliminação pelo sistema imune (LIU et al., 2007). No entanto, a restrição da sua função nas respostas dirigidas aos antígenos tumorais não é clara, comumente observadas nos tumores sólidos e relacionadas ao melhor (SALAMA et al., 2009) ou pior prognóstico (WOLF et al., 2005).

Nos casos de melanomas superficiais em humanos, o infiltrado inflamatório linfocítico tumoral (TIL), está relacionados ao melhor prognóstico, uma vez que é observado nos tumores superficiais e/ou em estágio de regressão (CLARK et al., 1989; MIHM e MULÉ, 2015; REDDY et al., 2014). Neste mesmo estudo, Clark e colaboradores (1989), estabeleceram critérios para a avaliação do TIL com base na sua ausência ou presença, e sua distribuição na massa tumoral como *brisk* (distribuição difusa), *non-brisk* (distribuição multifocal ou focal) e ausente. Em outro estudo com melanomas acrais em humanos, a ausência do TIL esteve relacionada a ocorrência de recidivas, metástases e a morte dos pacientes (LEE et al., 2013).

Em uma seleção de 669 melanomas malignos primários da pele em humanos, em estadio I, foi observado que a infiltração linfocitária não teve relação significativa com diversos fatores, a exemplo do sexo, idade do paciente, tipo de célula tumoral, pigmentação, atipia celular, índice mitótico e ulceração. Notada apenas, relação com a extensão tumoral superficial até a interface papilar-reticular da derme, enquanto que nos melanomas malignos nodulares, mais profundos, a presença de um denso TIL esteve relacionada ao pior prognóstico (LARSEN e GRUDE, 1978). Em um estudo com melanomas cutâneos em humanos na fase de crescimento vertical realizado por Clemente e colaboradores (1996), a análise multivariada revelou apenas a espessura tumoral e o TIL como fatores prognósticos histológicos positivos e independentes.

A ideia de uma vigilância imune ativa em pacientes portadores de melanoma se apoia na resposta imune tumoral e sistêmica, a partir da observação de remissões e regressões das lesões após tratamento imunoestimulante (MOCELLIN et al., 2013). No melanoma humano a imunidade mediada pelas células tem um papel importante, mas a exemplo do observado nos carcinomas mamários, depende dos subconjuntos celulares envolvidos, em especial as células T citotóxicas e T auxiliares. As células T no TIL estão em maior número quando comparadas as células B, com maioria constituída de células citotóxicas em repouso (HUSSEIN et al., 2006).

O aumento gradual do TIL durante as fases de desenvolvimento do melanoma pode refletir um aumento da antigenicidade das células tumorais (HUSSEIN et al., 2006). Nos melanomas cutâneos em humanos o aumento da densidade do TIL, composto por células T ativadas (LADÁNYI et al., 2004) ou independente da composição de células T ou B (ERDAG et al., 2012; LADÁNYI et al., 2011), esteve relacionado ao melhor prognóstico com a maior sobrevida e diminuição do número de metástases. Por outro lado, em estudo com 91 pacientes acompanhados durante 10 anos, revelou aumento na progressão da doença e diminuição da sobrevida naqueles em que o TIL tinha população de células B superior a 15% (MARTINEZ-RODRIGUES et al., 2014).

Atualmente são utilizados, com destacado sucesso, porém ainda com alto custo, inibidores de CTLA-4 (PRIETO et al., 2012) e da proteína anti-morte celular programada-1 (PD-1) (BURNS et al., 2016) no tratamento dos melanomas metastáticos. Estes agentes funcionam como moléculas inibitórias na superfície das células T, contrariando sinais supressivos e estimulando a resposta imune (BUCHBINDER e DESAI, 2016; CHIARUTTINI et al., 2017).

Na Medicina Veterinária, até o presente momento, a avaliação da resposta inflamatória linfocítica no melanoma canino restringe-se a identificação da presença ou ausência do

infiltrado nos tumores (análise qualitativa), sendo relatado um maior número de animais vivos quando havia presença do infiltrado inflamatório associado ao tumor (SPANGLER e KASS, 2006). Entretanto, não foram observados na literatura consultada estudos relacionados a caracterização das células inflamatórias, a distribuição e/ou intensidade da inflamação e sua correlação com a sobrevida.

2.3 CICLO CELULAR E PROGRESSÃO TUMORAL

No desenvolvimento normal do organismo humano e animal, o equilíbrio entre proliferação celular e a apoptose, dois eventos biológicos opostos, porém complementares, permite a manutenção da população celular normal dos tecidos (BRASILEIRO-FILHO, 2000; GRIVICICH et al., 2007; KING e CIDLOWSKI, 1998). A divisão celular é controlada por uma rede complexa de sinais que resultam da ação coordenada de agentes estimuladores e inibidores do ciclo celular como os fatores de crescimento, nutrientes, sinais mitogênicos e hormônios produzidos no meio intra ou extracelular (JOHNSON e WALKER, 1999; PELÚZIO et al., 2006; SILVA et al., 2004).

O crescimento celular normal e a replicação são eventos biológicos controlados pela ação opostora de proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Os proto-oncogenes como o ras, c-myc, bcl-2 e outros, codificam proteínas que promovem o crescimento e a replicação celular e inibem a apoptose (BORTNER e CIDLOWSKI, 2002; BRETONES et al., 2015; GRIVICICH et al., 2007). Por outro lado, os genes supressores tumorais como o p53, o p21, pRB e outros, codificam proteínas que regulam negativamente o crescimento celular, a replicação e podem induzir a apoptose da célula danificada (ANAZETTI e MELO, 2007; KING e CIDLOWSKI, 1998; LEE et al., 2015; PELÚZIO et al., 2006). Alterações na via p53 que resultam na ativação do p21 na regulação do ciclo celular pode contribuir para a progressão maligna do carcinoma hepatocelular (SHI et al., 2000).

No ciclo normal quando a célula recebe sinais promotores para seu crescimento, a síntese de ciclinas D e E é estimulada na fase G₁. A progressão das células da fase S para a fase G₂ é facilitada pelo controle da ciclina A ligada a CDK2 e CDK1 (KATSUNO et al., 2009). O papel exato da ciclina A não é conhecido, mas evidências sugerem que ela seja indispensável para a replicação do DNA. No início da fase G₂ predomina a ciclina B que, ao formar complexos com CDK1, auxilia a passagem da célula para a fase M e fosforila proteínas necessárias para a mitose (PELÚZIO et al., 2006; PINES, 1995;). As ciclinas assim denominadas por serem produzidas e degradadas de forma cíclica nas diferentes etapas do ciclo são indispensáveis para a manutenção da proliferação (EKHOLM e REED, 2000).

Sempre que necessário a proliferação celular é inibida pela ação de proteínas da família CIP/KIP (p21, p27 e p57) e da família INK4 (p15, p16, p18 e p19). Dentre estas proteínas as mais frequentemente observadas no processo de carcinogênese, por expressão negativa, são a p21 e a p27. Normalmente, elas se ligam ao complexo cdk/ciclina em determinada fase (p21) ou em qualquer fase do ciclo (p27), inibindo a formação desse complexo (LEE et al., 2015; RIBEIRO-SILVA e ZUCOLOTO, 2003) e a proliferação (EKHOLM e REED, 2000; GALEA et al., 2008). Assim como a p21, a p38 também desempenha um papel fundamental de interromper o ciclo celular, além de ser uma importante proteína no controle da senescência celular (MOH et al., 2008), apoptose e, assim, da carcinogênese (NAKATANI et al., 2001).

Modificações na expressão ou atividade dos reguladores do ciclo celular podem resultar na parada do ciclo, no retardo ou aceleração da fase do ciclo (PINES, 1995; PELÚZIO et al., 2006), em apoptose (ANAZETTI e MELO, 2007; BRETONES et al., 2015; GRIVICICH et al., 2007; OKAMOTO et al., 1996; STRASSER et al., 2000) e na proliferação celular desordenada (KUSEWITT e RUSH, 2009). Alguns estudos já demonstram correlação entre o aumento da expressão de ciclinas e o desenvolvimento neoplásico associado a um prognóstico desfavorável em seres humanos (BAHNASSY et al., 2004; BOSTRÖM et al., 2009; LOTAYEF et al., 2000; POIKONEN et al., 2005). O mesmo é observado quando ocorre regulação negativa da expressão de proteínas inibidoras da proliferação (JOHNSON e WALKER, 1999; KAWADA et al., 2002; NAM e KIM, 2008; SOMLO et al., 2008; TRIMIS et al., 2008).

Alguns reguladores do ciclo celular são atualmente estudados em linhagens celulares de melanomas humanos (AGUIRRE-GHISO et al., 2003), caninos (NOGUCHI et al., 2014) e de ratos (BELLEI et al., 2010), a exemplo do fator de transcrição associado à microftalmia (MiTF) (AIDA et al., 2017; CHELI et al., 2012) e da p38 (AGUIRRE-GUISO et al., 2003; BELLEI et al., 2010).

2.3.1 Fator de Transcrição Associado à Microftalmia (MiTF)

A família dos fatores de transcrição MiT é constituída pelo Fator de Transcrição Associado à Microftalmia (MiTF), o fator de transcrição E3 (TFE3), o fator de transcrição EB (TFEB) e o fator de transcrição EC (TFEC), os quais determinam a expressão gênica específica de enzimas que regulam a pigmentação (HEMESATH et al., 1994). O MiTF é um fator de transcrição específico da linhagem melanocítica que regula a expressão de genes essenciais para a síntese da melanina (CHELI et al 2010; LEVY et al., 2006; NGUYEN e FISHER, 2018; RODRIGUEZ et al., 2018).

A sua expressão é mantida na maior parte dos melanomas com amplificação do gene também nos focos metastáticos (KING et al., 2001). Acredita-se que as funções primárias do MiTF no melanoma incluem a manutenção da identidade da linhagem celular, a partir do controle dos marcadores de diferenciação celular e o seu papel anti-apoptótico (VLCKOVA et al., 2018). Alvos transcricionais funcionalmente importantes do MiTF incluem os reguladores do ciclo celular (CDK2, p21, p16), diferenciação, sobrevivência e metástase (BCL-2, c-MET), níveis de AMPc, reparo do DNA, invasividade e pigmentação (HSIAO e FISHER, 2014; LEVY et al., 2011). Os seus efeitos pró-sobrevivência não são restritos apenas a regulação de genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos, mas também neutraliza sinais indutores da morte celular (HARTMAN e CZYZ, 2015).

Carreira e colaboradores (2006) criaram um modelo para vincular os níveis de MiTF a um fenótipo celular, que a depender da expressão as células do melanoma podem se diferenciar ou proliferar: a alta atividade do MiTF promove a diferenciação celular com parada das células em G1 mediadas por p16 e p21; enquanto que, a sua baixa atividade está relacionada a um fenótipo infiltrativo, semelhante a célula tronco. Logo, a expressão de MiTF pode ser observada em diferentes níveis em subpopulações heterogêneas em uma mesma massa tumoral, como resultado da influência celular e do microambiente tumoral (HARTMAN e CZYZ, 2015).

Em estudo realizado com cultivos celulares de melanoma (SK-MEL-5, SK-MEL-28, A101D, MEL-HO, IPC-298 e SK-MEL-30) foi observada a supressão da expressão de MiTF e do número de células neoplásicas tratadas com uma droga anti-melanoma (CH6868398) (AIDA et al., 2017). Contrariamente, em estudo também realizado com cultivo celular de melanomas humanos, os elevados níveis de MiTF foram acompanhados da maior expressão de Bcl-2 e da sua atividade anti-apoptótica, associada a resistência as drogas (NAJEM et al., 2017).

Outro estudo *in vitro* com células de melanoma, avaliou o efeito da hipóxia na diminuição da expressão de MiTF através do fator induzível por hipóxia (HIF1), no qual reduziu a diferenciação celular e promoveu a proliferação e as propriedades relacionadas a metástases (CHELI et al., 2012). Vlckova e colaboradores (2018), observaram que os baixos níveis de MiTF em cultivos celulares de melanoma causou uma atenuação nas taxas de proliferação, ausência de características da transição epitelial-mesenquimal (EMT) nas células, diminuição das concentrações de tirosinase, mas manteve a proliferação celular e não afetou a invasividade. Em pacientes humanos com melanoma, a amplificação de MiTF foi associada a uma diminuição de cinco anos nas taxas de sobrevida (GARRAWAY et al., 2005).

Quando expostas de forma prolongada a citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , a expressão do MiTF nas células do melanoma foi suprimida (REINHARDT et al., 2017). Esta

baixa expressão do MiTF promove a ativação da resposta inflamatória com recrutamento de células imunes predominantemente mielóides (RIESENBERG et al., 2015).

2.3.2 MAPK/p38

As proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) consistem nas cascatas de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK), c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p38 (WHITMARSH e DAVIS, 2000). Essas proteínas podem ser ativadas por diversos tipos de estímulo e estão envolvidas em importantes processos biológicos, como proliferação, diferenciação, transformação e morte celular a partir da expressão de genes e/ou interagindo com outras cascatas de sinalização (LOESCH e CHEN, 2016).

A ação da via ERK é frequentemente ativada por mitógenos (MANSOUR et al., 1994), enquanto que por outro lado, as vias JNK e p38 são responsivas ao estresse e a citocinas liberadas nas respostas inflamatórias (XIA et al., 1995). Cães que tiveram as células do miocárdio estimuladas ou passaram por estresse oxidativo, tiveram concentrações elevadas de p38 e consequente aumento do número de células em apoptose (SHENG et al., 2012).

A via p38 age como supressor para a sinalização de RAS, e inibe a expressão do gene da ciclina D1, um importante efector da proliferação celular. A atividade da via p38 na maioria das vezes é pró-apoptótica, podendo ser um componente importante na inibição do crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo* (LOESCH e CHEN, 2016), exceto em melanomas de seres humanos induzidos pela radiação UV, devido a regulação da apoptose por uma nova via, não relacionada a p38 (IVANOV e RONAI, 2000).

In vivo, a p38 suprime o desenvolvimento do câncer hepático em associação com a estimulação da resposta inflamatória (HUI et al., 2007) ou por diminuir o acúmulo de reativos de oxigênio (SAKURAI et al., 2008) causadores de danos ao fígado de ratos. Enquanto que, em ratos com exclusão do gene p38 notou-se o crescimento acentuado de carcinoma pulmonar (VENTURA et al., 2007). Em estudo com células de carcinoma *in vivo* realizado com embriões de pintos e ratos, foi observado que o equilíbrio da expressão de ERK e p38 mantém as células estagnadas (AGUIRRE-GHISO et al., 2001).

Nos melanócitos, o α -MSH ativa a quinase p38 e está promove a melanogênese e inibe o crescimento de células em cultivo do melanoma B16 em murinos (SMALLEY e EISEN, 2000). Por outro lado, Shen e colaboradores (2012) notaram que a diminuição da atividade da tirosinase e da formação de melanina está relacionada a ativação das vias ERK e p38, e consequente supressão de MiTF.

Em estudo realizado por Aguirre-Ghiso e colaboradores (2003) com cultivos celulares de células de carcinoma epidermoide humano (HEp3), carcinoma de próstata (PC3), MDA-MB-231 / MDA-MB-453 / MDA-MB-468 / MCF-7 (carcinoma mamário), fibrossarcoma (HT1080) e melanoma metastático (M24met), revelou que na cultura de HEp3 o aumento da atividade de p38 inibiu a atividade de ERK e bloqueou a proliferação celular, mas que *in vivo* mantêm as células que já se disseminaram dormentes, diferente dos outros tipos celulares avaliados. Na linhagem M24met apesar dos elevados índices de p38 *in vivo*, as células mantiveram o crescimento a partir de outras vias moleculares de montagem de proteínas.

Um dos mecanismos de controle da proliferação de células neoplásicas é a indução da senescência das mesmas, um processo irreversível da parada do ciclo celular que limita a progressão das células danificadas (DIMRI et al., 1995). A p38 está envolvida na formação dos focos de heterocromatina associados a senescência (SAHF), um dos indicadores de células somáticas senescentes, em resposta a agentes quimioterápicos (doxorubicina), mediando desta forma a supressão tumoral (ZHANG et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resposta inflamatória associada aos melanomas caninos e sua atuação nos diferentes sítios anatômicos (boca, dígito e pele), avaliar a expressão e as correlações do MiTF e p38^{MAPK} com fatores prognósticos e sobrevida

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as principais raças acometidas, faixa etária, localização e padrão histológico nos melanomas em cães;

Caracterizar quanto ao tipo celular predominante, intensidade, distribuição e localização dos focos inflamatórios associados aos melanomas, bem como sua correlação com a regressão ou progressão tumoral;

Identificar a expressão dos linfócitos T CD4⁺ e T CD4⁺FoxP3⁺ em melanomas da cavidade oral / dígitos em cães e sua correlação com progressão tumoral;

Comparar a expressão imuno-histoquímica do MiTF e p38^{MAPK} em melanomas cutâneos e da cavidade oral / dígitos;

Correlacionar os resultados da inflamação, MiTF e p38^{MAPK} com fatores prognósticos e taxa de sobrevida.

4. HIPÓTESES

A resposta inflamatória associada aos melanomas em cães promove o desenvolvimento tumoral independente da distribuição, intensidade e/ou constituição do infiltrado celular;

Os tumores maiores localizados na cavidade oral e dígitos estão relacionados ao TIL com maior população de células T CD4⁺ e T CD4⁺FoxP3⁺;

Os melanomas localizados na cavidade oral e dígitos, bem como suas metástases, apresentam baixa expressão de MiTF e de p38^{MAPK};

Animais com maiores taxas de sobrevida apresentam melanomas com infiltrado linfocítico e expressão de MiTF e p38^{MAPK}.

5 MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL

Foram utilizadas as bases físicas e a infraestrutura do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Medeiros Neto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV/EMEVZ-UFBA), do Laboratório de Patologia Veterinária Histopathus, o Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz-Bahia (IGM/Fiocruz-BA) e Laboratório de Patologia Comparada (LPC) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA (Protocolo 010/2018) (Anexo 1).

AMOSTRAS

Foram analisadas 117 amostras de melanomas (orais/dígitos ou cutâneos) obtidos de cães de diversas raças, cujas amostras foram enviadas ao Laboratório particular de Patologia Veterinária (Bahia-Brasil) no período de 2012 a 2017. Os casos selecionados foram divididos em dois grupos, o primeiro constituído por animais com melanomas localizados na cavidade oral ou dígito (74) e o segundo composto de animais com melanoma cutâneos (43).

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

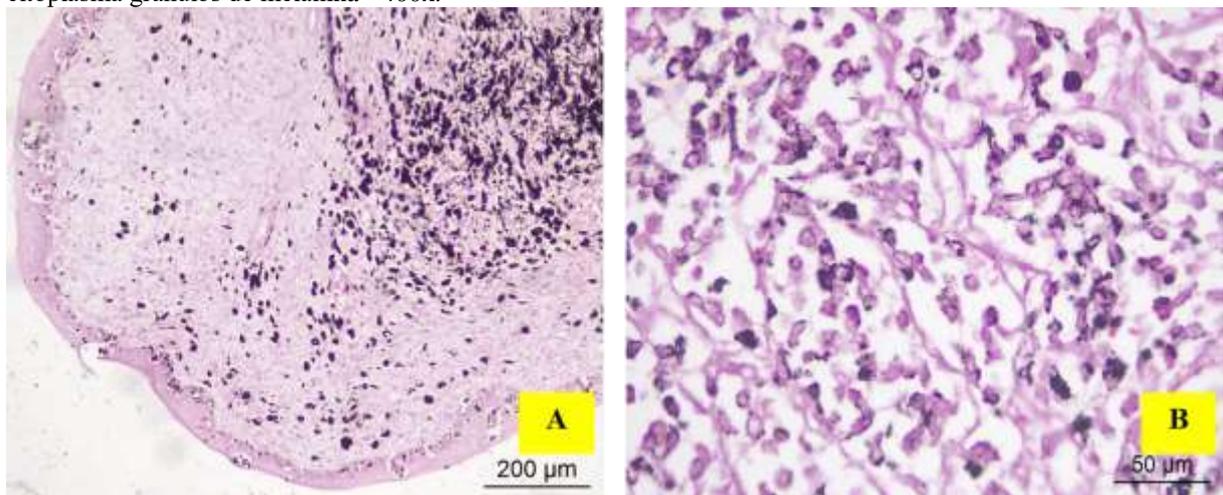
Foram coletados das fichas de requisição dos exames, os dados referentes à raça, idade, sexo e a localização da lesão.

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Amostras histológicas de melanomas caninos, fixadas em formol neutro e tamponado com fosfato (monobásico e dibásico) a 10%, incluídas em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (PROPHET et al, 1992) foram analisados em microscopia óptica para classificação segundo os parâmetros da OMS (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017) por dois patologistas veterinários, de forma individualizada e sem o conhecimento do

diagnóstico anterior. Os casos com diagnóstico confirmado pelos dois avaliadores foram inseridos no estudo. Os casos em que à análise imuno-histoquímica era necessária para a confirmação diagnóstica devido à ausência de melanina foram excluídos do estudo. Nos casos com baixa produção de melanina foi realizada a marcação histoquímica com Fontana-Masson (BUSAM et al., 2001) para a detecção da melanina (Figura 1). Na avaliação microscópica foram determinados o padrão (tipo) histológico, o grau de atípia nuclear, o escore de pigmentação, o índice mitótico, a presença de ulceração e necrose e caracterizada a inflamação associada ao tumor.

Figura 1 - Secções histológicas coradas com Fontana-Masson evidenciando (A) melanoma com grande quantidade de melanina evidenciada após marcação histoquímica - 40x. B) Destaque – células neoplásicas contendo no citoplasma grânulos de melanina - 400x.



Fonte: Laboratório Histopathus.

Padrão histológico

Foi observada a morfologia das células quanto as suas características histológicas predominantes no tumor como epitelioides, células alongadas/fusiformes ou misto (presença dos dois padrões histológicos) (GOLDSCHMIDT, 1985; GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017).

Atípia nuclear

Foram contadas 100 células na objetiva de maior aumento (400x), sendo atribuída uma pontuação numérica que corresponde à % de células com núcleos atípicos. Essas células foram divididas em graus: leve (0 a 39%), moderada (40 a 79%) e grave (80 a 100%). Quando necessário, foi realizada outra secção de forma prévia para a despigmentação (remoção da

melanina), com a utilização de peróxido de hidrogênio (30 volumes) em uma diluição a 10% por 30 minutos a uma temperatura de 65°C (LIU et al., 2013), seguido de lavagem em água corrente e posterior coloração pela HE.

Pigmentação celular

A pigmentação do citoplasma das células neoplásicas foi avaliada subjetivamente em toda a secção histológica e classificada de acordo com a porcentagem das células contendo melanina, como: leve (1-10%), moderada (11-50%) e alta (>50%).

Índice mitótico

O índice mitótico foi determinado em secções histológicas coradas em HE, com o auxílio de um microscópio Leica ICC50 E equipado com uma ocular de 10X e uma objetiva de 40X, que forneceu uma área de campo de 0,239mm². Foram identificadas e quantificadas as mitoses em 10 campos e obtida a média por caso. Sendo considerado como elevado a média igual ou superior a três e quatro mitoses por campo nos tumores cutâneos e orais/dígitos, respectivamente (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017).

ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO TUMORAL

A análise morfológica da reação inflamatória associada ao tumor foi realizada nos melanomas, quanto a sua distribuição e intensidade, foi realizada nos oito campos mais representativos (“*hotspots*”), com auxílio de um microscópio Leica ICC50 E (ocular 10X e objetiva de 40X), nas secções histológicas, segundo protocolo estabelecido por Clark e colaboradores (1989), que estabeleceram critérios para a avaliação do infiltrado linfocítico intratumoral (TIL) como *brisk* (distribuição difusa), *non-brisk* (distribuição multifocal ou focal) e ausente. A intensidade da reação inflamatória foi categorizada em três subgrupos (discreta, moderada ou intensa).

Para a análise morfométrica após a identificação e marcação dos oito campos, foram realizadas a captura de imagens em câmera digital adaptada a um Microscópio Leica ICC50 E, utilizando-se o software de captura LAS[®] versão 4.8.0 e o software Corel DRAW[®] versão 7.468 para análise das imagens. Linfócitos, macrófagos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos foram identificados com base nas suas características morfológicas e quantificados nas imagens capturadas de secções coradas pela HE. O número total de células foi obtido pela soma dos oito campos analisados, sendo a média utilizada para determinar os pontos de corte e os intervalos

de intensidade. O infiltrado inflamatório foi classificado em: i) leve; ii) moderado; e iii) intenso (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 - Intervalo de intensidade dos tipos celulares inflamatórios no microambiente tumoral dos melanomas localizados na cavidade oral e dígitos.

Tipo celular	Intensidade		
	Leve	Moderada	Intensa
Linfócito	$X < 150$	$150 \leq X < 270$	$x \geq 270$
Macrófago	$X < 30$	$30 \leq X < 50$	$x \geq 50$
Plasmócito	$X < 20$	$20 \leq X < 30$	$x \geq 30$
Neutrófilo	$X < 05$	$05 \leq X < 10$	$x \geq 10$
Eosinófilo	$X < 03$	$03 \leq X < 07$	$x \geq 07$
Total	$X < 210$	$210 \leq X < 370$	$x \geq 370$

Critério de caracterização com números obtidos a partir das médias e dos limites superiores e inferiores.

Tabela 2 - Intervalo de intensidade dos tipos celulares inflamatórios no microambiente tumoral dos melanomas cutâneos.

Tipo celular	Intensidade		
	Leve	Moderada	Intensa
Linfócito	$X < 50$	$50 \leq X < 190$	$x \geq 190$
Macrófago	$X < 15$	$15 \leq X < 35$	$x \geq 35$
Plasmócito	$X < 10$	$10 \leq X < 30$	$x \geq 30$
Neutrófilo	$X < 05$	$05 \leq X < 10$	$x \geq 10$
Eosinófilo	$X < 03$	$03 \leq X < 07$	$x \geq 07$
Total	$X < 85$	$85 \leq X < 275$	$x \geq 275$

Critério de caracterização com números obtidos a partir das médias e dos limites superiores e inferiores.

AValiação Imuno-Histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Advance™ HRP*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA ou *Novolink Polymer Detection Sistem*; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK ou *Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)*, Nicherei Fresh Inc., Chun, Tokyo, Japan). A recuperação antigênica ocorreu pelo calor úmido (banho-maria a 98°C) ou calor úmido pressurizado a 125°C (*Pascal® Pressure Cooker*; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) com *Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0* (Dako

Cytomation, Glostrup, Denmark) ou EDTA ph 9,0. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 10 minutos em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum-Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 30 minutos (anti-MiTF, anti-p38^{MAPK}, anti-CD4⁺ e anti-FoxP3⁺) e do cromógeno 3’3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 1 minuto. Após incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 10 minutos e então limpos em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim álcool isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. Para controle negativo foi omitida a etapa do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os dados dos anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Dados referentes aos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Origem	Clone	Diluição	Localização
Anti-MiTF	Abcam	D5	1:60	Nuclear
Anti-p38	Abcam	M138	1:100	Nuclear/Citoplasmática
Anti-CD4 ⁺	Ebioscience	Gk1.5	1:100	Citoplasmática
Anti-FoxP3 ⁺	Santa Cruz	2a11g9	1:100	Citoplasmática

Para a análise da imunomarcagem dos anticorpos MiTF e p38^{MAPK}, após a identificação e marcação dos oito campos mais representativos (“*hotspots*”) em cada caso, foi realizada a captura de imagens em câmera digital Zeiss AxioCam/cc5 adaptada a um Microscópio Carl Zeiss Scope.A1, utilizando-se o software de captura Versão Zen 2012 (Blue Edition – Service Pack 1)[®] e o software Corel DRAW[®] versão X7 para análise das imagens. Somente a marcação presente foi considerada, independente da intensidade da mesma.

Enquanto que para a análise da imunomarcção dos anticorpos CD4⁺ e FoxP3⁺ nos linfócitos, após a identificação e marcação dos oito campos mais representativos (“*hotspots*”) do TIL em cada caso do melanoma localizado na cavidade oral ou dígito, foi realizada a captura de imagens em câmara digital Zeiss AxioCam/cc5 adaptada a um Microscópio Carl Zeiss Scope.A1, utilizando-se o software de captura Versão Zen 2012 (Blue Edition – Service Pack 1)[®] e o software Corel DRAW[®] versão X7 para análise das imagens. Somente a marcação presente foi considerada, independente da intensidade da mesma.

Interpretação da Imuno-histoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 40x (Olympus – BX41). A avaliação do MiTF e da p38^{MAPK} foi feita de forma quantitativa a partir da contagem de células imunomarcadas em toda a secção histológica avaliada em campos histológicos de maior aumento (400X) e classificadas em escores de 0 (marcação ausente), 1 (< 25% das células), 2 (>25 e <50% das células) e 3 (> 50% das células) (FOX et al., 2012; MOURIAUX et al., 2003; SHAH et al., 2010; STAMBE et al., 2014). A avaliação dos linfócitos imunomarcados para CD4⁺ e FoxP3⁺ foi obtida pelo número de células a partir da análise da soma das células, em dez campos histológicos de maior aumento (40X). Sendo os resultados expressos como o número médio das células positivas.

SOBREVIDA

Foram realizadas consultas aos médicos veterinários solicitantes dos exames histopatológicos e as fichas clínicas, nas quais foram coletados dados sobre a sobrevida global. O tempo de sobrevida global foi definido (em dias) como sendo o período entre a exérese cirúrgica do tumor primário e a data de óbito ou eutanásia pela doença.

Foram obtidas ainda informações referentes a retirada completa ou não da lesão no momento da colheita da amostra para o exame histopatológico, se o paciente passou por algum tratamento além do procedimento cirúrgico. Os casos em que não foi possível obter essas informações e/ou o paciente evoluiu para o óbito ou submetido a eutanásia, por causa diferente ao melanoma, não foram inseridos na análise da sobrevida.

Nos animais que evoluíram para o óbito/eutanásia foi realizada a necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária/HOSPMEV-UFBA, após a autorização do tutor, para determinação da *causa mortis* e detecção de possíveis metástases.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, para avaliação da normalidade da distribuição, os dados foram submetidos a teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos e não paramétricos foram utilizados o teste t de Student /Mann-Whitney U (comparação de dois grupos), ou ANOVA / Teste de Kruskal-Wallis (mais de dois grupos), respectivamente. Da mesma forma possíveis correlações foram investigadas pelos testes de Pearson ou Spearman (SAMPAIO, 2002). As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox) ou Cox na análise univariada ou multivariada, respectivamente.

Os dados foram agrupados da seguinte forma: localização do melanoma (oral/dígito ou cutâneo); tamanho do tumor (<2 cm ou ≥ 2 cm); metástase para linfonodos (sim ou não; não avaliado); ulceração (sim ou não), necrose (sim ou não), pigmentação (leve ou intensa); atipia nuclear (leve, moderada, intensa); índice mitótico (<3 ou ≥ 3 mitoses por campo – tumores cutâneos; <4 ou ≥ 4 mitoses por campo – tumores na cavidade oral); distribuição inflamatória (*brisk*, *non-brisk* ou ausente); intensidade inflamatória (leve, moderada ou intensa); intensidade do infiltrado inflamatório linfocitário (<270 ou <190 linfócitos para tumores em oral/dígito e cutâneos, respectivamente); marcações imuno-histoquímicas (ausente ou presente); sobrevida (baixa- menor ou igual a 6 meses / alta- maior ou igual a 7 meses). Em todos os casos, o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o softwares Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA) e SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

6 RESULTADOS

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

De outubro de 2012 a dezembro de 2017 (série de cinco anos) foram realizados 3.111 exames histopatológicos de amostras provenientes de cães. Dentre esses casos, 143 correspondiam a biópsias com diagnóstico de distúrbios proliferativos de melanócitos em cães, representando 4,59% na espécie canina, com 117 melanomas e 26 melanocitomas.

A maioria dos cães acometidos pelo melanoma eram machos [63/117 (54%)], enquanto as fêmeas representavam a menor população [54/117 (46%)]. As idades médias para os cães diagnosticados com melanomas localizados na cavidade oral/dígito e pele foram 11,6 anos (2-17anos) e nove anos (1-15anos), respectivamente.

As principais raças observadas nos animais diagnosticados com melanoma oral/dígito foram a Rotweiller [13/74 (18%)], Poodle [12/74 (16%)], SRD [10/74 (14%)] e Cocker Spaniel [08/74 (11%)] (Tabela 4). Nos melanomas cutâneos destacaram-se os animais SRD [07/43 (16%)], seguidos pelas raças Yorkshire [05/43 (12%)] e Pinscher [04/43 (9%)] (Tabela 5).

Tabela 4 - Frequência dos animais SRD e das raças de cães acometidos com melanoma oral/dígito diagnosticados em uma série de cinco anos (2012-2017).

Raça	Nº de casos	(%)
Rotweiller	13	18
Poodle	12	16
SRD	10	14
Cocker Spaniel	8	11
Yorkshire	6	08
Dachshound	5	07
Labrador	4	05
Pitbull	2	03
Chow chow	2	03
Não informada	2	03
Pastor Alemão	2	03
Husky Siberiano	2	03
Spitz Alemão	1	01
Pointer	1	01
Galgo Italiano	1	01
Golden	1	01
Schnauzer	1	01
Pequinês	1	01
Total	74	100

Tabela 5 - Frequência dos animais SRD e das raças de cães acometidas com melanoma cutâneo diagnosticados em uma série de cinco anos (2012-2017).

Raça	Nº de casos	(%)
SRD	7	16
Yorshire	5	12
Pinscher	4	09
Poodle	3	07
Dachshund	3	07
Schnauzer	3	07
Doberman	2	05
Pastor Alemão	2	05
Não informada	2	05
Pitbull	2	05
Labrador	1	02
Rotweiler	1	02
Golden Retriever	1	02
Cocker Spaniel	1	02
American	1	02
Bull Terrier	1	02
Chow Chow	1	02
Sharpei	1	02
Scottish Terrier	1	02
Shih Tzu	1	02
Total	43	100

Macroscopicamente a maior parte dos melanomas cutâneos apresentavam mensuração inferior a 2,0 cm [33/43 (77%)]. Nos melanomas orais/dígitos grande parte das lesões tinham dimensões iguais ou maiores que 2,0 cm [37/74 (50%)] (Tabela 6). A ulceração foi uma observação macroscópica frequente na maioria dos melanomas, independentemente da localização oral/dígito ou cutânea [80/117 (68%)]. (Tabela 6).

Quando informados, os locais mais acometidos na cavidade oral pelo melanoma foram, as gengivas [25/59 (42%)], lábios [11/59 (19%)] e palato [07/59 (12%)]. Enquanto que a menor parte deste grupo estavam localizados nos dígitos [15/74 (20%)]. Nos casos dos melanomas cutâneos, em 77% (33/43) das lesões a localização não foi informada e em 23% (10/43) dos casos estavam localizadas nas pálpebras.

AValiação Histopatológica

Os principais resultados referentes a avaliação histopatológica dos melanomas encontram-se na tabela 6.

Índice mitótico

A maioria dos melanomas orais/dígitos [39/74 (53%)] apresentavam índice mitótico igual ou superior a quatro mitoses por objetiva de maior aumento. Enquanto que, os melanomas cutâneos apresentavam na sua maioria [36/43 (84%)] um baixo índice mitótico, inferior a três mitoses por campo (Tabela 6).

Tipo histológico

O padrão misto foi o predominante nos melanomas, independentemente da localização [oral/dígito - 31/74 (42%) e cutâneo - 24/43 (56%)], seguido pelo tipo epitelióide [30/74 (41%)] nos tumores orais/dígitos (Figura 2) (Tabela 6).

Pigmentação celular

Quanto a produção de melanina, os melanomas cutâneos tiveram, na sua maioria, alta produção do pigmento [30/43 (70%)]. Enquanto, os melanomas orais/dígitos apesar do predomínio da alta pigmentação, também apresentaram uma grande quantidade de tumores amelanóticos ou com baixa produção de melanina [34/74 (46%)] (Figura 2) (Tabela 6).

Metástase em linfonodo regional

A avaliação histopatológica de linfonodos regionais para a pesquisa de metástase não foi realizada com frequência nos animais diagnosticados com melanoma. Em apenas 8% (09/117) dos casos os linfonodos foram enviados para análise, sendo diagnosticada metástase em 78% (07/09), todas em casos de neoplasias localizadas na cavidade oral e dígitos (Tabela 6).

Atipia nuclear

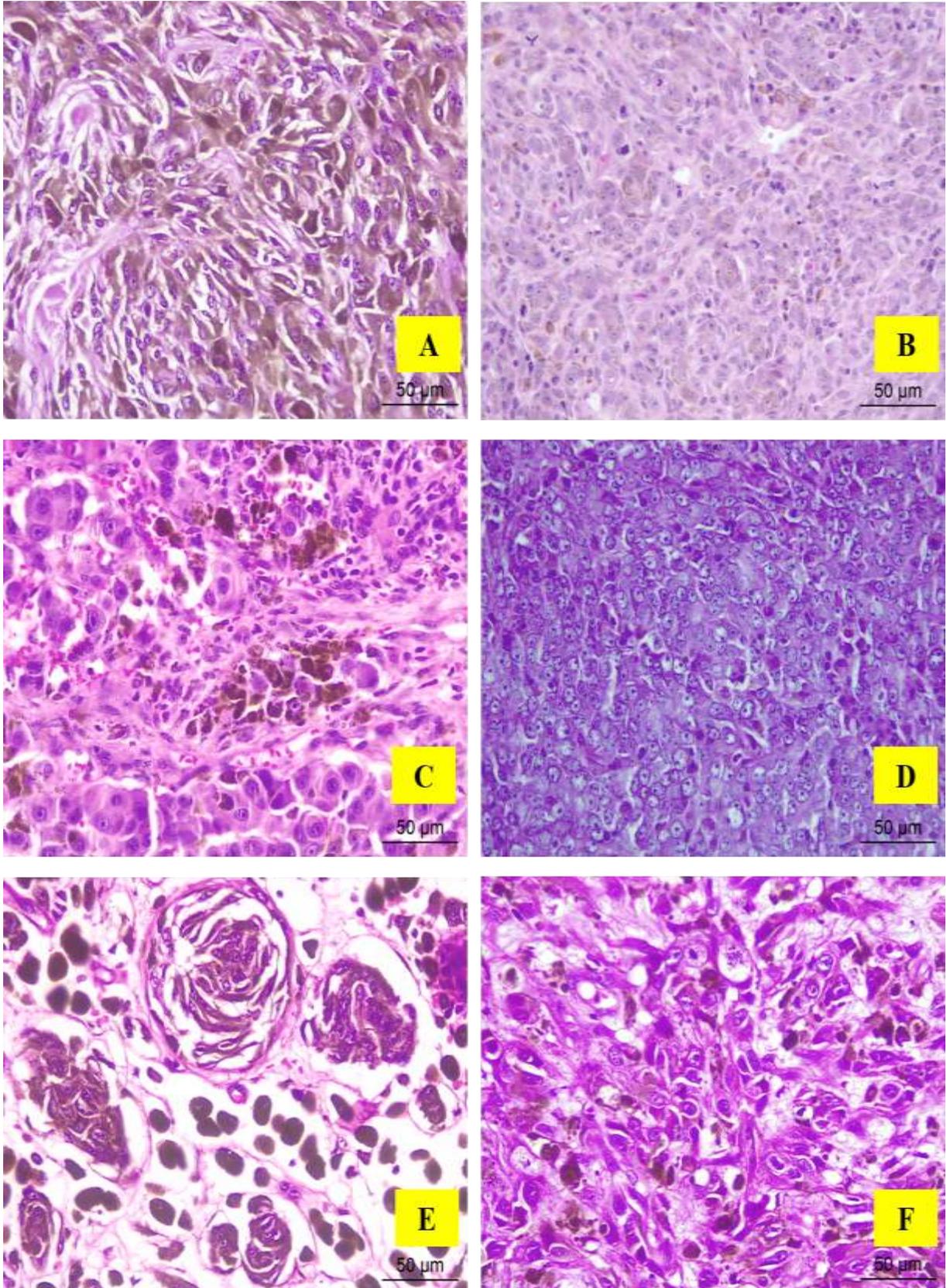
A análise da intensidade de atipia nuclear revelou associação significativa ($p < 0,0001$) com a localização do tumor. Com o predomínio da intensidade moderada e intensa de pleomorfismo, principalmente aqueles localizados na cavidade oral e dígitos (Figura 2) (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição da frequência das características histológicas em 117 melanomas em cães.

Características		Melanoma	Melanoma
Histológicas		oral/dígito	cutâneo
Ulceração	<i>Não</i>	15/74 (20%)	19/43 (44%)
	<i>Sim</i>	59/74 (80%)	24/43 (56%)
Mitose	<i><3/ <4</i>	35/74 (47%)	38/43 (88%)
	<i>≥3 / ≥4</i>	39/74 (53%)	05/43 (12%)
Tipo Histológico	<i>Misto</i>	31/74 (42%)	24/43 (56%)
	<i>Epiteloide</i>	30/74 (41%)	11/43 (25%)
	<i>Alongadas</i>	13/74 (17%)	08/43 (19%)
Pigmentação	<i>Baixa</i>	34/74 (46%)	13/43 (30%)
	<i>Elevada</i>	40/74 (54%)	30/43 (70%)
Metástase	<i>NA</i>	65/74 (88%)	43/43 (100%)
	<i>Não</i>	02/74 (03%)	00/43 (00%)
	<i>Sim</i>	07/74 (09%)	00/43 (00%)
Atíпия nuclear	<i>Discreta</i>	05/74 (06%)*	04/43 (09%)
	<i>Moderada</i>	39/74 (53%)*	28/43 (65%)
	<i>Intensa</i>	30/74 (41%)*	11/43 (26%)

NA = não avaliado / *p<0,05.

Figura 2 – Fotomicrografias de melanoma canino coradas com HE exemplificando os critérios avaliados, como os diferentes graus de atipia nuclear – A) leve, B) moderada e C) intensa. D) Melanoma do tipo epitelióide com leve produção de melanina. E) Melanoma de células alongadas dispostas em ninhos, na sua maior contendo melanina. F) Melanoma com padrão histológico misto, células epitelióides e alongadas com leve produção de melanina - 400X.



Fonte: Laboratório Histopathus.

6.2.6 Avaliação do infiltrado inflamatório nos melanomas

Infiltrado inflamatório total

Verificou-se ausência de resposta inflamatória em 60% (26/43) dos casos de melanomas cutâneos, diferentemente dos orais/dígitos nos quais a resposta inflamatória esteve presente em [58% (43/74)] (Tabela 7). Em todos os melanomas avaliados o infiltrado inflamatório era multifocal (*non-brisk*) intratumoral (Figura 3). Em nenhum caso havia infiltrado com distribuição difusa (*brisk*), independentemente da localização do tumor (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição do infiltrado inflamatório nas neoplasias melanocíticas em cães.

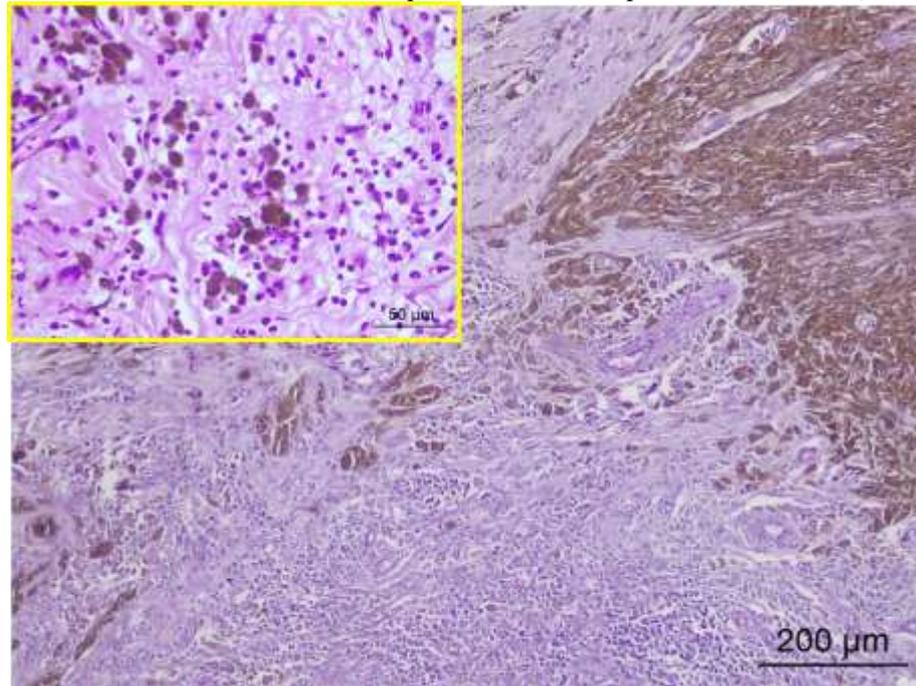
Distribuição	Melanoma oral/dígito	Melanoma cutâneo
Ausente	42%(31/74)	60%(26/43)
Brisk	00%(00/74)	00%(00/43)
No-Brisk	58%(43/74)	40%(17/43)

A avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório total, quando presente, evidenciou um predomínio da intensidade leve, em ambas localizações do melanoma. Porém, infiltrados com intensidade moderada foram mais frequentemente observados associado aso tumores localizados nas cavidade oral e dígitos (Tabela 8).

Tabela 8 - Avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório nas neoplasias melanocíticas em cães.

Intensidade	Melanoma oral/dígito	Melanoma cutâneo
Ausente	42%(31/74)	60 (26/43)
Leve	46%(34/74)	37%(16/43)
Moderado	11%(08/74)	03%(01/43)
Intenso	01%(1/74)	0,0%(0/43)

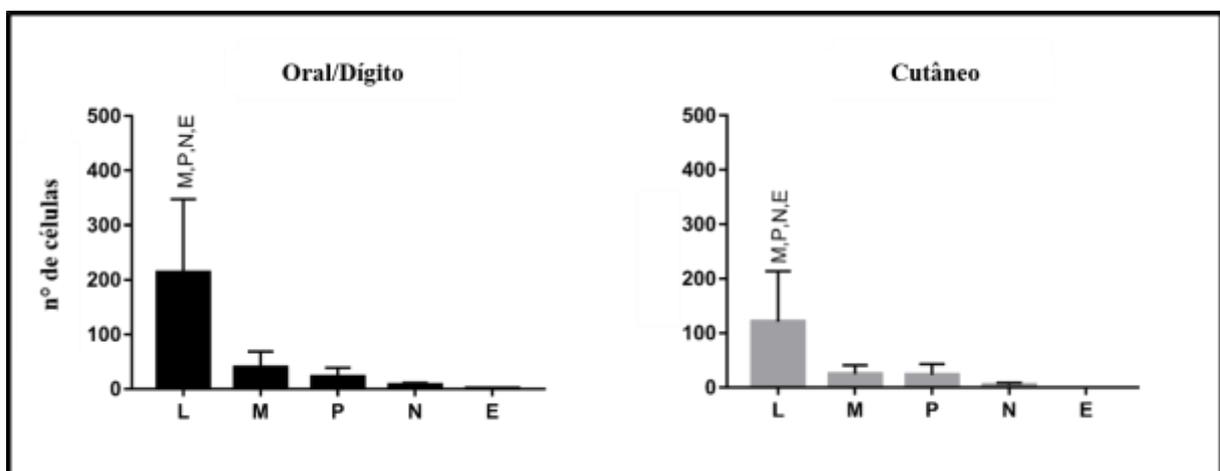
Figura 3 - Fotomicrografia com infiltrado inflamatório associado ao melanoma – intenso infiltrado inflamatório intratumoral localmente extenso - 40x, constituído predominantemente por linfócitos - 400x (detalhe).



Fonte: Laboratório Histopathus.

A avaliação morfométrica revelou ser o linfócito o tipo celular predominante na resposta inflamatória associada aos melanomas, sem distinção quanto a localização, seguido dos macrófagos e plasmócitos. (Figura 4). Os neutrófilos quando presentes estavam relacionados as lesões ulceradas.

Figura 4 - Composição do infiltrado inflamatório associado aos melanomas caninos.

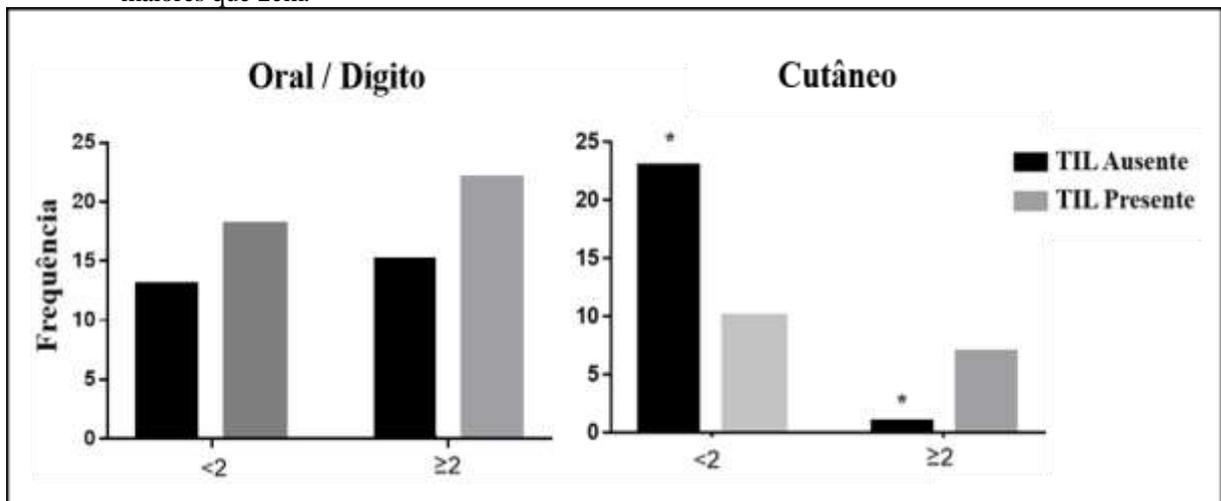


Legenda: L= linfócitos, M= macrófagos, P= plasmócitos, N= neutrófilos e E= eosinófilos.

Infiltrado inflamatório linfocítico (TIL)

A avaliação do TIL revelou maior frequência da resposta inflamatória nos tumores localizados na cavidade oral e dígitos. Quando se avaliou a presença do TIL nos tumores localizados na boca e dígitos segregando os mesmos por suas dimensões (<2 ou ≥2cm), observa-se um predomínio da presença da inflamação linfocítica, independentemente do tamanho das lesões. Enquanto nos tumores cutâneos o TIL esteve ausente na grande maioria dos tumores menores que 2cm ($p < 0,0109$). Nas neoplasias cutâneas de maiores dimensões a presença do TIL foi mais frequente (Figura 5).

Figura 5 - Frequência do infiltrado linfocítico associado aos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores que 2cm.

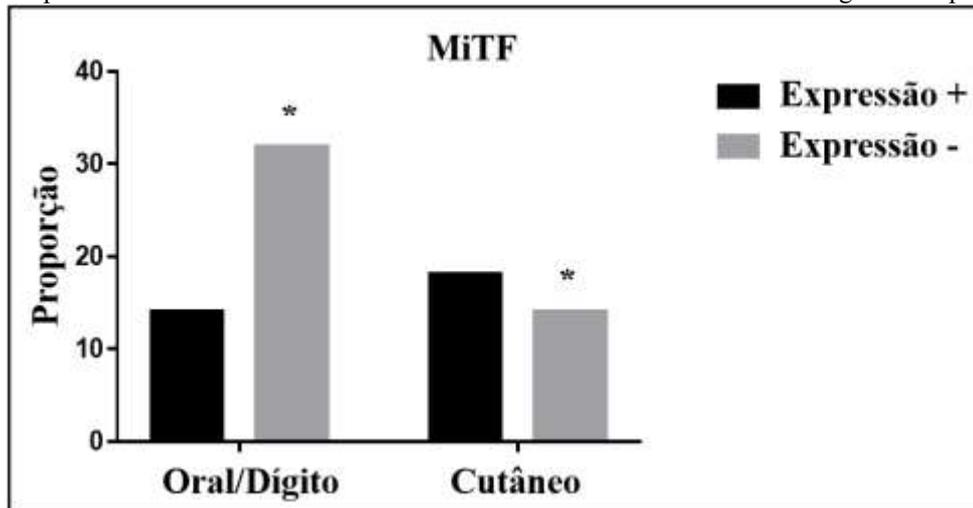


* $p < 0,05$

Avaliação imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica revelou associação positiva entre a expressão do MiTF e da proteína p38 ($p = 0,0268$). Foi observada maior expressão do MiTF nos melanomas localizados na pele, quando comparados aqueles localizados na cavidade oral ou dígitos ($p = 0,0347$) (Figura 6) (Figura 14).

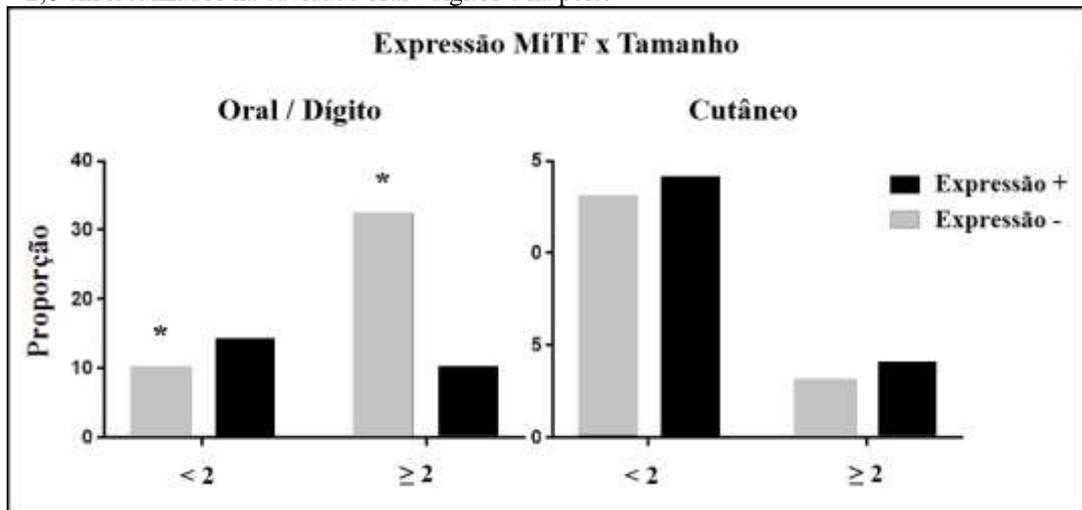
Figura 6 – Expressão do MiTF nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



*p<0,05

As lesões localizadas na cavidade oral / dígito maiores de 2,0 cm tinham menor expressão do MiTF (p=0,0077). Os tumores cutâneos apresentam uma maior expressão do MiTF independentemente das dimensões da lesão (Figura 7).

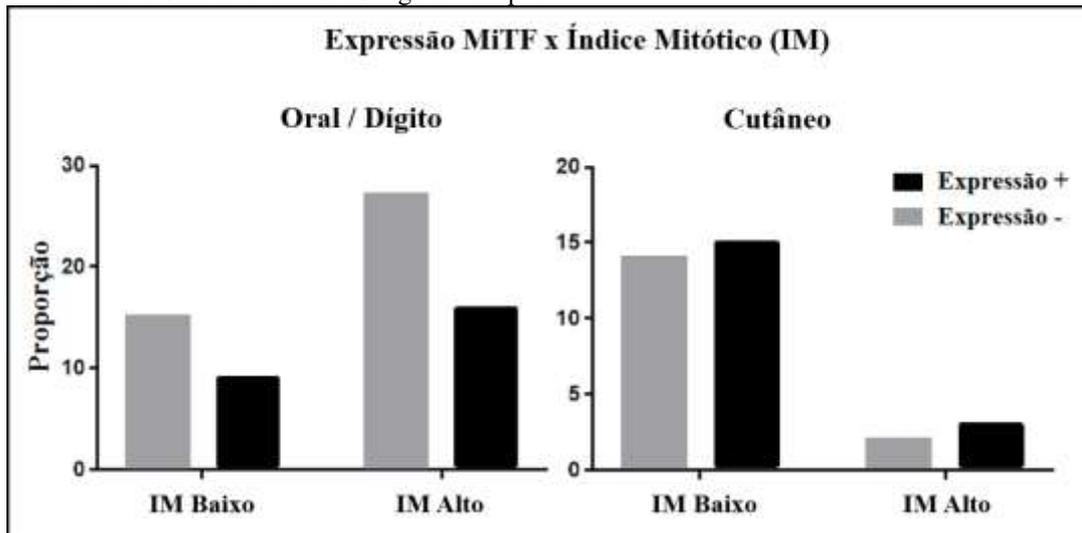
Figura 7 – Comparação da expressão do MiTF nos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores de 2,0 cm localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



*p<0,05

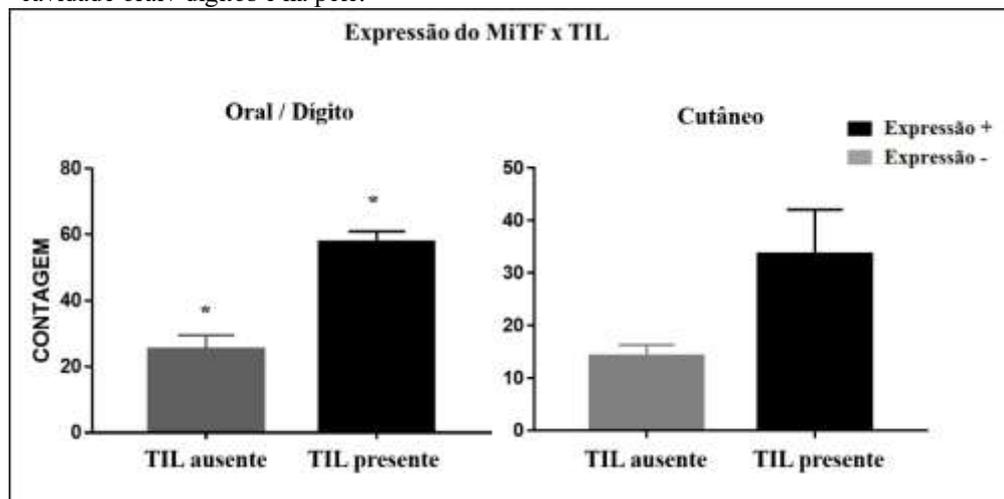
A não expressão do MiTF esteve relacionada principalmente ao índice mitótico elevado nos tumores da cavidade oral/dígito e nos cutâneos uma maior expressão nos casos com índice mitótico baixo ou alto (Figura 8).

Figura 8 – Comparação da expressão do MiTF nos melanomas caninos com diferentes índices mitóticos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



A comparação do MiTF com a resposta inflamatória demonstrou uma maior expressão do MiTF nos tumores em que o TIL esteve presente, independentemente da localização na cavidade oral/dígito ($p=0,0004$) ou pele ($p=0,1318$) (Figura 9).

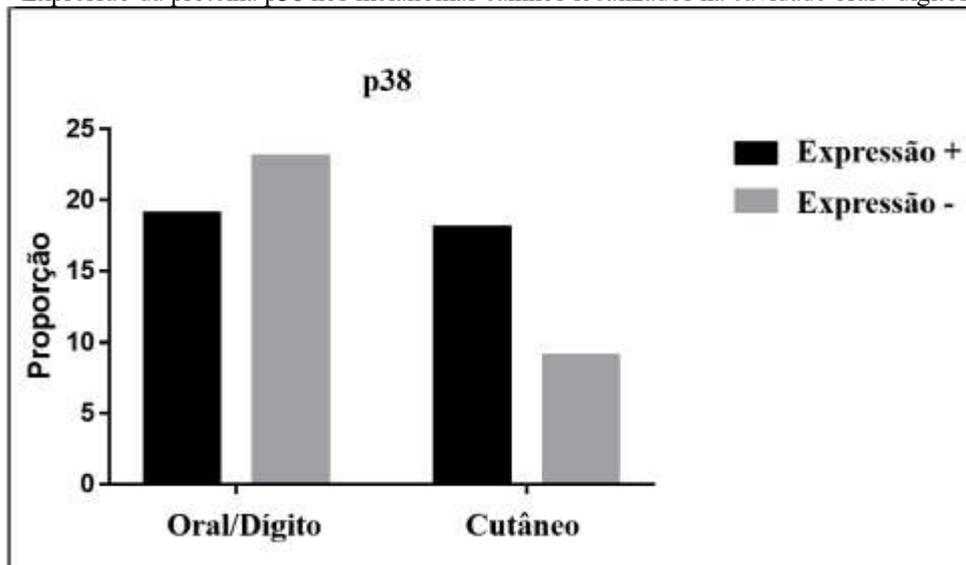
Figura 9 – Associação entre a expressão do MiTF com a presença do TIL nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



* $p < 0,05$

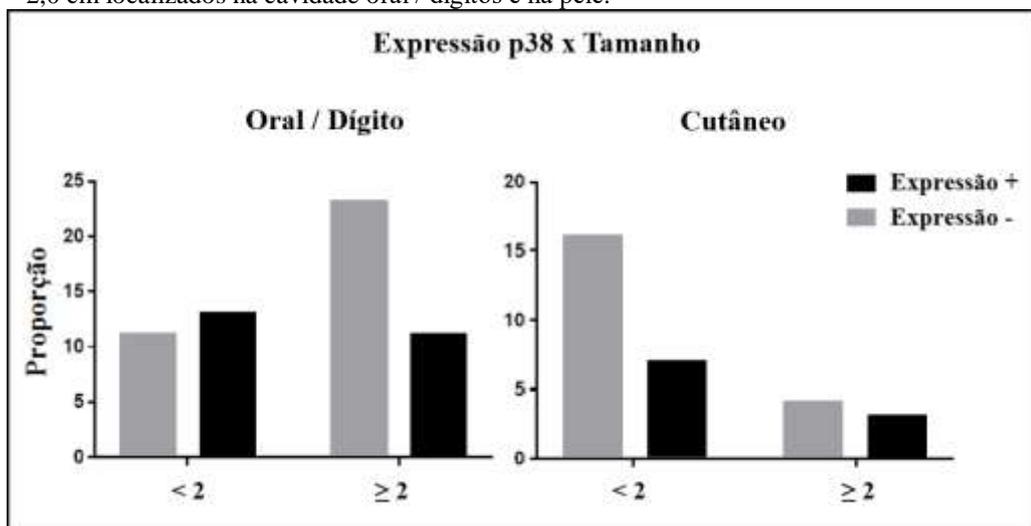
A imunomarcagem da proteína p38 nos melanomas revelou uma maior expressão nos tumores localizados na pele ($p=0,0913$) (Figura 10) (Figura 14).

Figura 10 – Expressão da proteína p38 nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



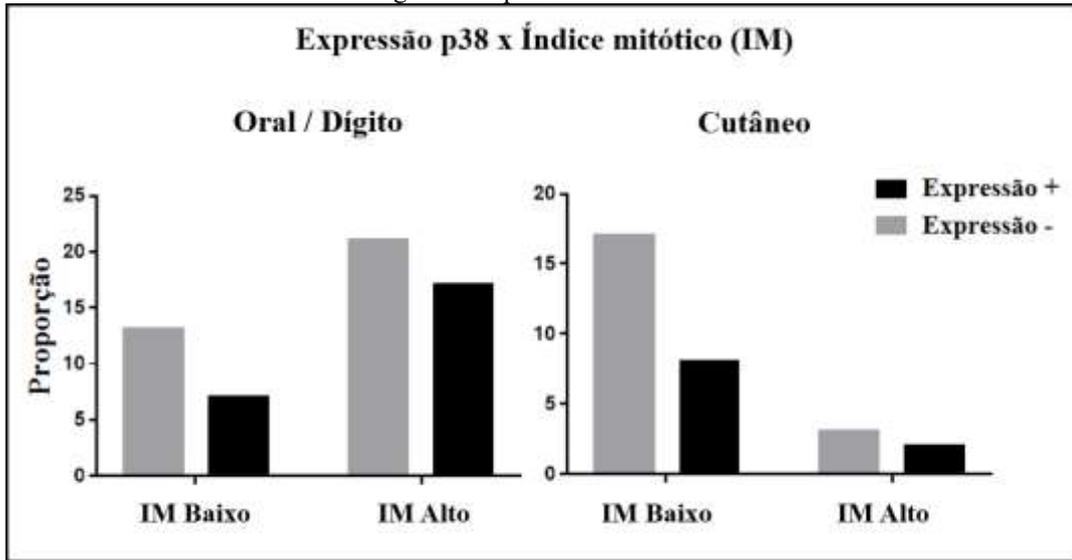
As lesões localizadas na cavidade oral/dígito menores de 2,0 cm tinham maior expressão da p38, diferente das lesões cutâneas, as quais a não expressão foi mais frequente nos melanomas de diferentes dimensões (Figura 11).

Figura 11 – Comparação da expressão do MITF nos melanomas caninos com dimensões menores ou maiores de 2,0 cm localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



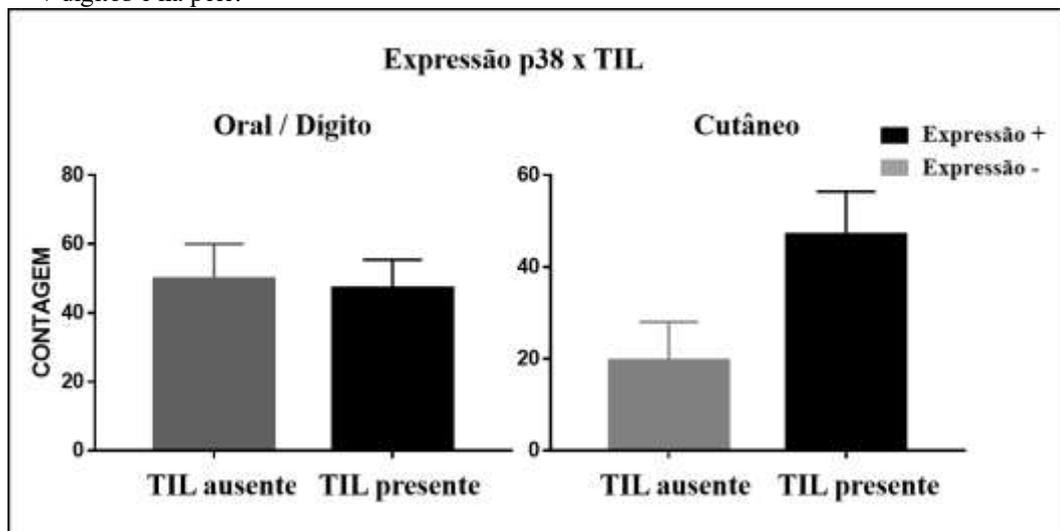
Houve uma menor expressão da p38 na maior parte das lesões independentemente da sua localização ou índice mitótico (Figura 12).

Figura 12 – Comparação da expressão do p38 nos melanomas caninos com diferentes índices mitóticos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.



A expressão de p38 foi similar nos melanomas localizados na cavidade oral / dígito ($p=0,9188$). Enquanto nos tumores cutâneos esteve mais expressa nas lesões onde o TIL esteve presente ($p=0,2857$) (Figura 13).

Figura 13 – Associação entre a expressão da p38 com o TIL nos melanomas caninos localizados na cavidade oral / dígitos e na pele.

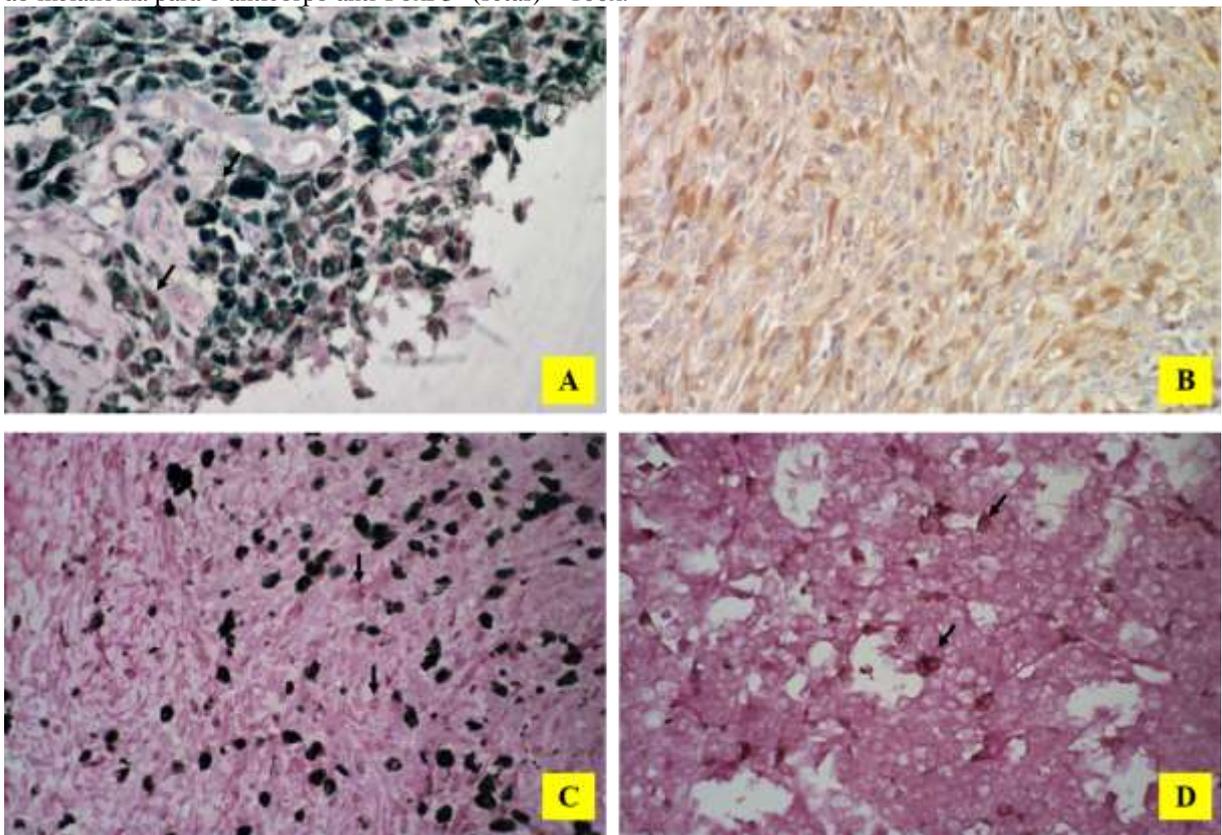


A comparação da imunomarcção no TIL associado aos melanomas localizados na cavidade oral/dígitos demonstrou uma maior população de células T CD4⁺ nos tumores com maiores dimensões, menor índice mitótico ($p=0,001$), maior expressão de MiTF ($p=0,036$) e

com menor expressão de p38. A expressão da FoxP3⁺ nos linfócitos teve expressão semelhante, exceto em relação a p38.

Nos animais com metástase, a massa primária e os focos metastáticos não apresentavam expressão de MiTF e p38 nas células tumorais, nem associação com TIL.

Figura 14 – Fotomicrografias de melanoma canino, reação imuno-histoquímica A) Imunomarcção nuclear (setas) em melanócitos neoplásicos para o anticorpo anti-MiTF – 400x. B) Imunomarcção citoplasmática em melanócitos neoplásicos para o anticorpo anti-p38 – 400x. C) Imunomarcção de linfócitos presentes no TIL associado ao melanoma para o anticorpo anti-CD4⁺ (setas) – 100x. D) Imunomarcção de linfócitos presentes no TIL associado ao melanoma para o anticorpo anti-FoxP3⁺ (setas) – 100x.



Fonte: LAPEX/FioCruz-BA / Laboratório de Patologia Comparada ICB/UFG

Avaliação da sobrevida

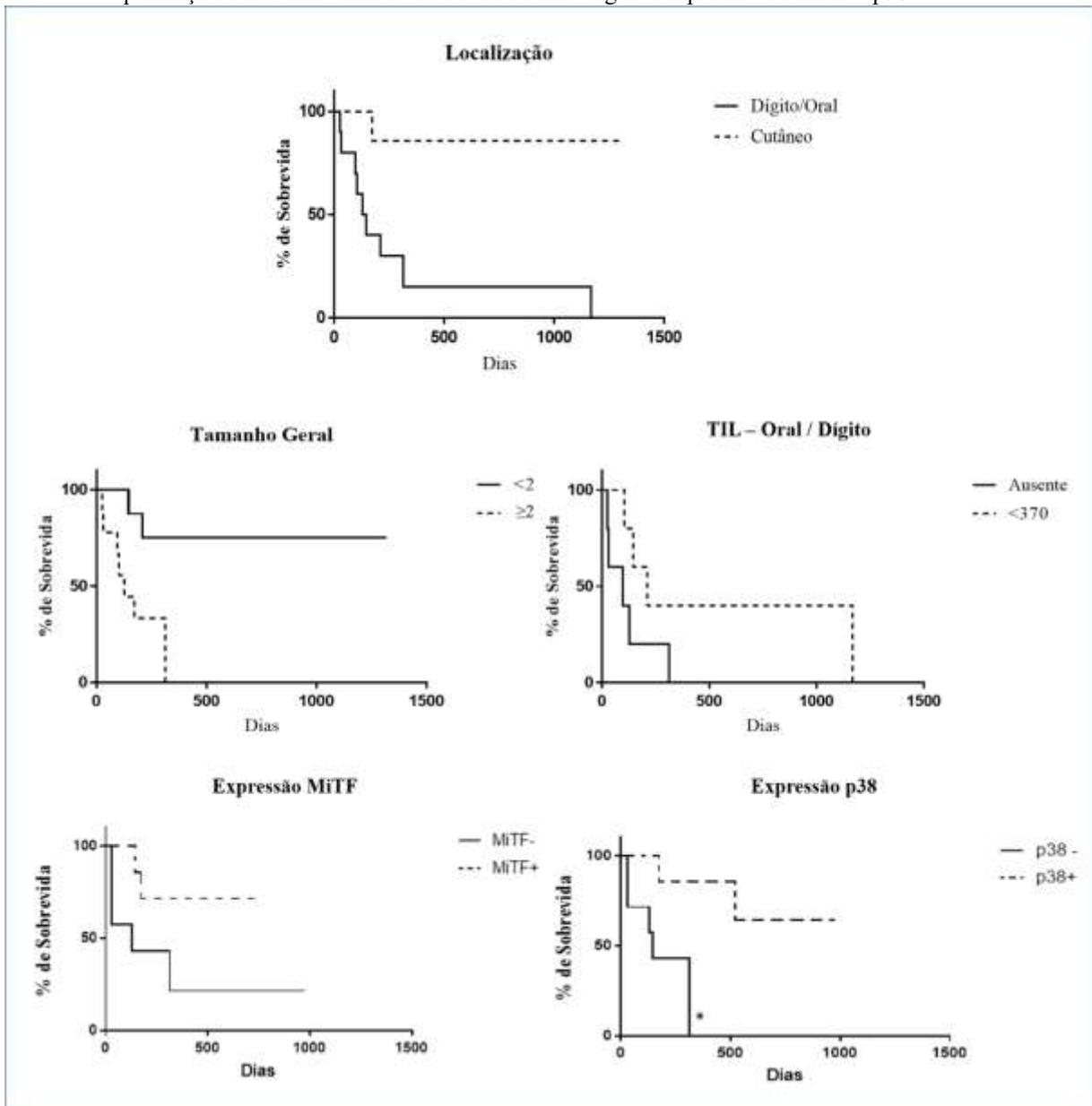
Para avaliação da curva de sobrevida foram obtidas informações sobre 17 animais (10 oral / dígito e 7 cutâneo) e foi realizada a estratificação com base no diagnóstico localização dos melanomas, tamanho, presença ou ausência do TIL nos melanomas da cavidade oral/dígito e expressão do MiTF e p38 (Figura 15).

A sobrevida mínima após a cirurgia foi de 27 dias (macho, raça Dachshund, melanoma em cavidade oral, >2cm, tipo histológico misto com baixa produção de melanina) e o maior

período, dentro do intervalo de estudo, foi de 1169 dias (macho, raça Rotweiller, melanoma em dígito, <2cm, tipo histológico células alongadas com alta produção de melanina), com uma mediana de sobrevida de 136 dias.

Animais com maior expressão de células FoxP3⁺ possuíam uma menor taxa de sobrevida e estavam mortos. Enquanto animais com um número menor dessas células apresentavam maior sobrevida e estavam vivos até a última data de acompanhamento pelo clínico responsável.

Figura 15 - Curvas de sobrevida estratificadas pela localização, tamanho tumoral independente da localização, presença do TIL nos tumores em cavidade oral/dígito e expressão de MiTF e p38.



As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier, seguido pelo teste de Log-rank. Diferenças significativas para $p < 0.05$ foi destacado por asterisco.

Animais necropsiados

Dos 117 animais que tiveram amostras selecionadas para a análise, quatro foram submetidos a eutanásia, devido ao quadro avançado da doença e prognóstico desfavorável, e doados pelos tutores para a realização do exame necroscópico para avaliação da extensão da lesão e a pesquisa de metástases.

Dos quatro cães avaliados dois apresentavam a lesão primária localizada na gengiva e/ou palato, com dimensões superiores a dois centímetros. O terceiro animal possuía múltiplas lesões cutâneas menores que dois centímetros distribuídas por todo o corpo. Já o quarto apresentava lesão oral em gengiva mandibular com grandes dimensões e múltiplas lesões cutâneas menores (milimétricas a <2cm) distribuídas multifocalmente (tórax, dorso, membros, abdômen), todas diagnosticadas como melanoma.

Durante o exame necroscópico foram detectadas metástases em linfonodos e pulmão (4/4 - 100%), miocárdio, diafragma, fígado, rim e próstata (2/4 – 50%), testículo, glândula adrenal, pleura, músculo intercostal, costela, encéfalo e meninge (1/4 – 25%) (Figuras 16). Foi realizada avaliação histopatológica de todas as lesões observadas a macroscopia com confirmação do diagnóstico de metástase de melanoma (Figuras 17 e 18).

Análise univariada e multivariada

As análises uni e multivariadas foram realizadas nos melanomas baseados na sua localização (cavidade oral e dígitos ou cutâneos). Foi realizada ainda a avaliação uni e multivariada dos 51 pacientes em que foram obtidas informações quanto à sobrevida.

Melanomas orais/dígitos

A análise univariada revelou que os parâmetros clínico-patológicos correlacionados à presença do TIL foram a ulceração, a mitose e a atipia nuclear. Enquanto na análise multivariada, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tamanho da lesão, o tipo histológico, a produção de melanina e a atipia nuclear (Tabela 09).

Melanomas cutâneos

A análise univariada revelou que os parâmetros clínico-patológicos correlacionados à presença do TIL foram o tamanho e a mitose. Na análise multivariada, o resultado apresentou relação significativa com o tamanho da lesão, a mitose e o tipo histológico (Tabela 10).

Tabela 09 - Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos associados com a presença do TIL nos melanomas orais/dígitos em cães.

Parâmetros	Univariada	Multivariada
<i>Tamanho da lesão</i>	0,820	0,003*
<i>Presença de ulceração</i>	0,036*	0,284
<i>Índice mitótico</i>	0,049*	0,165
<i>Tipo histológico</i>	0,0868	0,010*
<i>Presença de necrose</i>	0,276	0,089
<i>Produção de melanina</i>	0,373	0,004*
<i>Atipia nuclear</i>	0,018*	0,032*

*Selecionado pelas análises uni e multivariada. Para a análise univariada foi utilizada a Correlação de Spearman para verificação entre variáveis. Análise multivariada – regressão logística. Diferenças significativas para $p < 0.05$ foi destacado por asterisco.

Tabela 10 - Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos associados com a presença do TIL nos melanomas cutâneos em cães.

Variável de desfecho	Univariada	Multivariada
<i>Tamanho da lesão</i>	0,002*	0,003*
<i>Presença de ulceração</i>	0,297	0,286
<i>Índice mitótico</i>	0,003*	0,004*
<i>Tipo histológico</i>	0,178	0,046*
<i>Presença de necrose</i>	0,057	0,055
<i>Produção de melanina</i>	0,626	0,616
<i>Atipia nuclear</i>	0,832	0,919

*Selecionado pelas análises uni e multivariada. Para a análise univariada foi utilizada a Correlação de Spearman para verificação entre variáveis. Análise multivariada – regressão logística. Diferenças significativas para $p < 0.05$ foi destacado por asterisco.

Melanomas com taxas de sobrevida

A análise univariada correlacionando os parâmetros clínico-patológicos e a presença do TIL relacionados às taxas de sobrevida foram tamanho, ulceração, necrose, produção de melanina e a atipia nuclear. Na análise multivariada, o resultado apresentou relação significativa com a condição, o infiltrado linfocítico e o tamanho (Tabela 11).

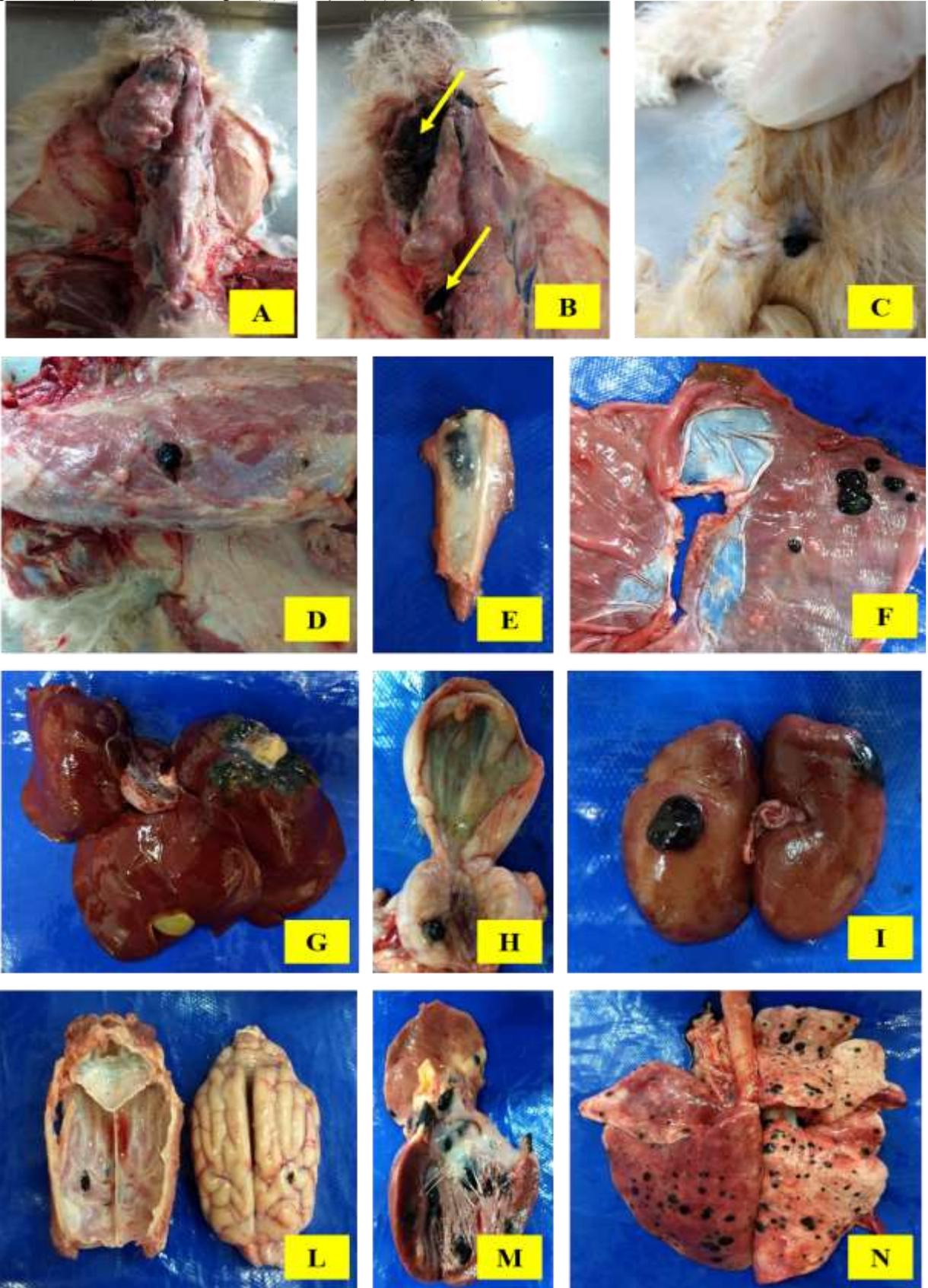
Estes resultados indicam que a presença do TIL tenha desta forma influência com o crescimento e a progressão tumoral, uma vez que está relacionado a fatores prognósticos relacionados a um pior prognóstico.

Tabela 11 - Análises univariada e multivariada dos parâmetros clínico-patológicos e o TIL associados com a sobrevida nos melanomas em cães.

Variável de desfecho	Univariada	Multivariada
<i>Condição (vivo ou morto)</i>	0,623	0,000*
<i>TIL (ausente ou presente)</i>	0,467	0,017*
<i>Tamanho da lesão</i>	0,027*	0,001*
<i>Presença de ulceração</i>	0,027*	NS
<i>Índice mitótico</i>	0,205	NS
<i>Tipo histológico</i>	0,153	0,999
<i>Presença de necrose</i>	0,027*	NS
<i>Presença de metástase</i>	0,623	NS
<i>Produção de melanina</i>	0,005*	NS
<i>Atipia nuclear</i>	0,038*	0,235

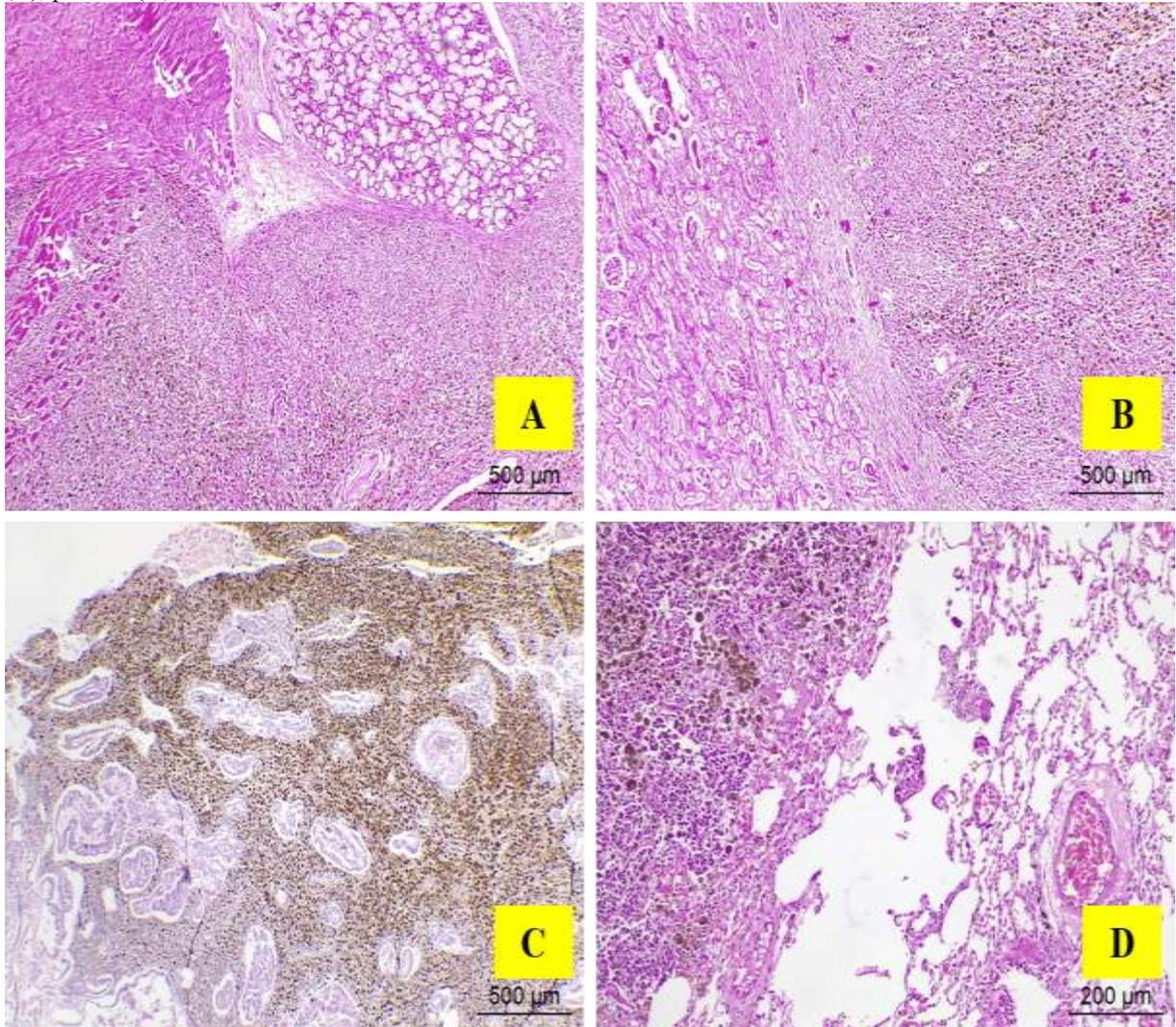
*Selecionado pelas análises uni e multivariada. Para a análise univariada foi utilizada a Correlação de Sperman para verificação entre variáveis. Análise multivariada – regressão logística. Diferenças significativas para $p < 0.05$ foi destacado por asterisco. NS – não significativo.

Figura 16 – Cão com melanomas localizados primariamente na cavidade oral e pele. Lesões em gengiva do ramo mandibular direito (A) com superfície de corte enegrecida e metástase para linfonodo submandibular (setas) (B). Nódulos cutâneo (C) e subcutâneo (D). Focos de metástase neoplásica para costela (E), diafragma (F), fígado (G), próstata (H), rim (I), meninges (L), coração (M) e pulmão (N).



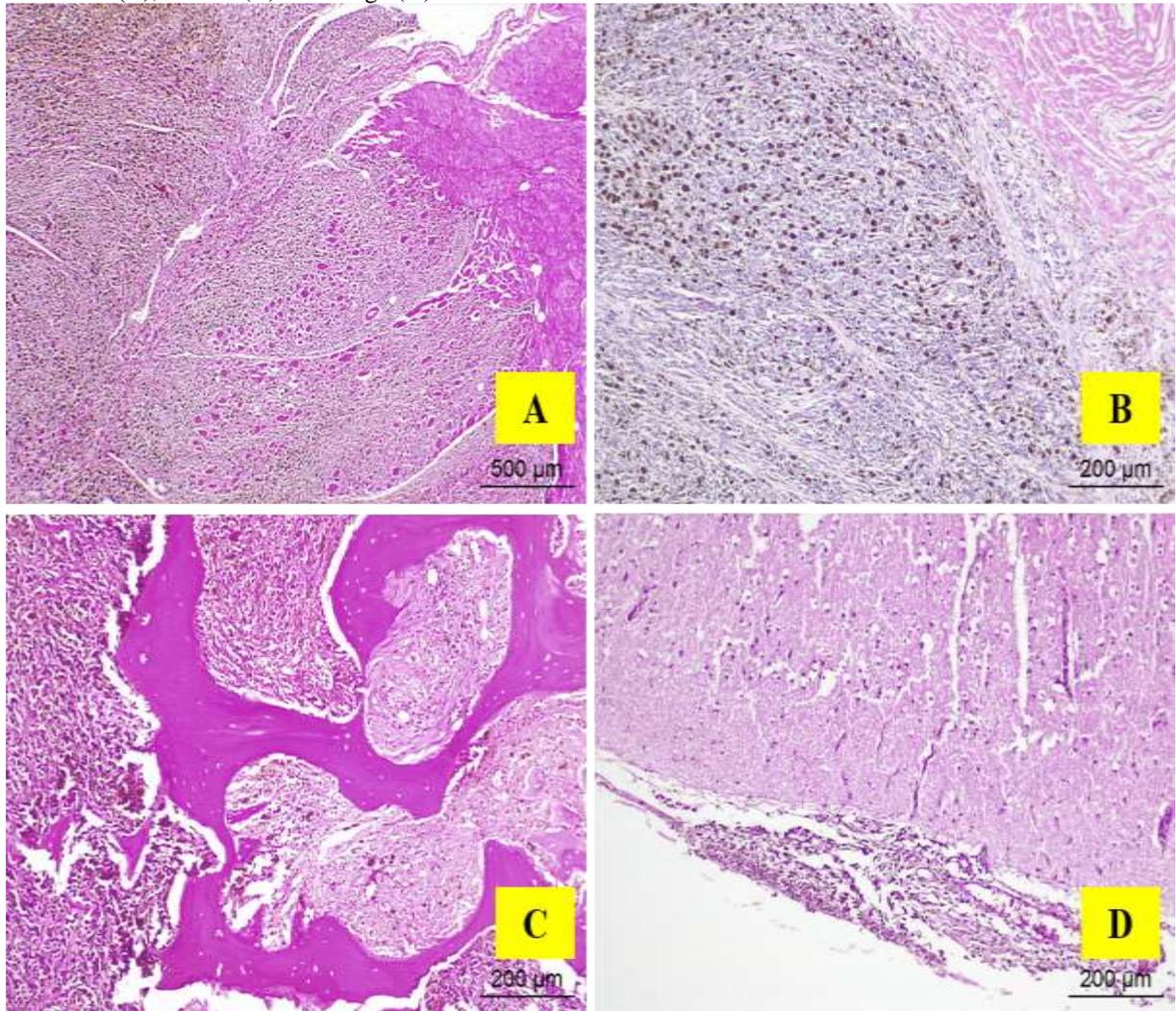
Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17 - Secções histológicas coradas em HE evidenciando (A) proliferação de melanócitos neoplásicos em cavidade oral, se estendendo as proximidades da glândula salivar, com focos de metástases para rim (B), próstata (C), pulmão (D) – 40X/40X/40X/100X.



Fonte: Laboratório Histopathus.

Figura 18 - Secções histológicas coradas em HE evidenciando metástases de melanoma para diafragma (A), miocárdio (B), costela (C) e meninge (D) – 40X/100X/100X/100X.



Fonte: Laboratório Histopathus.

7 DISCUSSÃO

A etiopatogenia dos melanomas nos cães ainda não é totalmente compreendida, mas aparentemente, difere do que se observa em humanos pois não está relacionada diretamente a exposição à radiação ultravioleta (GROSS et al., 2009) e sim a uma interação complexa entre fatores ambientais e genéticos (BANDARCHI et al., 2013). Mesmo com a sua etiologia incerta, alguns fatores prognósticos dos melanomas são conhecidos, contudo, diante da heterogeneidade desses tumores, o seu comportamento biológico nem sempre é previsível.

A maioria dos estudos disponíveis na literatura consultada indicam ausência de predisposição quanto ao sexo para o desenvolvimento do melanoma (BERGMAN 2007; GOMES et al., 2009). Contudo, alertam para uma leve superioridade numérica dos casos em machos (CAMARGO et al., 2008; GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017), a exemplo do observado no presente estudo. Esta discreta superioridade possivelmente resulte da prevalência de cães machos na população canina como já relatado por Canatto e colaboradores (2012) e Silva e colaboradores, (2010) em estudos de caracterização demográfica e epidemiológica. Divergindo da maioria, Ramos-Vara e colaboradores (2000) e Rolim e colaboradores (2012), ao estudar 129 e 35 casos de melanomas em cães, respectivamente, verificaram um maior número de fêmeas acometidas.

Quanto a média de idade, animais portadores de melanoma cutâneo apresentaram idades variando de 1 a 15 anos, com média de 9,0 anos, um pouco inferior a sugerida por outros estudos que é de 10 anos de idade (BERGMAN 2007; CAMARGO et al., 2008; GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT 2017; ROLIM et al., 2012). Em estudo retrospectivo de 338 casos de melanoma oral canino, Ramos-Vara e colaboradores (2000) observaram idade média de 11,4 anos (01-19 anos), semelhante à média obtida neste levantamento para os melanomas orais, que foi de 11,6 anos.

As raças Chow Chow, Golden Retriever, Labrador Retriever, Schnauzer, Cocker Spaniel, Poodles e os cães SRD, que apresentam pele e mucosas mais pigmentadas são mais acometidas pelo melanoma oral (CAMPAGNE et al., 2013; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002; RAMOS-VARA et al., 2000). No presente estudo algumas dessas raças, a exemplo da Rotweiller e Poodle e os cães racialmente indefinidos (SRD) apresentaram maior frequência de melanomas na cavidade oral ou dígitos. Com relação aos melanomas cutâneos, verificou-se resultado semelhante ao descrito na literatura, com animais SRD mais afetados, seguidos pelas raças Yorkshire e Pinscher (CAMARGO et al., 2008). A considerável frequência dos animais SRD, tanto na avaliação dos melanomas oral/digito quanto cutâneo, pode ser creditada ao

grande número desses animais compoem a população canina do país (CANATTO et al., 2012; MACHADO et al., 2018; SILVA et al., 2010).

A maior predisposição ao desenvolvimento de melanomas, independentemente, da localização observada, nas raças com pele, mucosa e/ou pelos pigmentados difere do constatado em seres humanos, nos quais a maior frequência de melanomas ocorre em indivíduos de pele clara, em especial os ruivos expostos a radiação solar e sucinta uma discussão bem interessante. Pessoas com este fenótipo possuem maior proporção de feomelanina em relação a eumelanina, pois são portadores de variantes polimórficas não funcionais do MC1R nos melanócitos, proteína que está envolvida nos principais sistemas na regulação da pigmentação de mamíferos, influenciando o tipo e quantidade de melanina sintetizada (NGUYEN e FISHER, 2018). Desta forma, a não predisposição dos cães para o melanoma secundário a exposição a radiação UV pode ser explicada por uma maior proporção da eumelanina nas raças com pele e mucosa pigmentadas, por outro lado, o que poderia ser um fator de proteção torna-se nesta espécie um fator predisponente, pois os distúrbios proliferativos de melanócitos em cães ocorrem com maior frequência em regiões pigmentadas (CAMPAGNE et al., 2013; GOLDSCHMIDT e HENDRICK, 2002).

As lesões melanocíticas variam muito de tamanho, desde pequenas máculas a grandes massas (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017). A avaliação macroscópica revelou que a maior parte dos melanomas cutâneos eram menores que dois centímetros, corroborando a média descrita na literatura para essas lesões cutâneas em cães (CAMARGO et al. 2008). Nos melanomas orais e digitais grande parte das lesões, foram enviadas para análise anátomo-histopatológica, em sua totalidade e possuíam dimensões iguais ou maiores a dois centímetros. Esses resultados divergem dos observados por Ramos-Vara e colaboradores (2000) que relataram dimensões inferiores nos casos avaliados. Contudo, cabe ressaltar que a mensuração da lesão no estudo de Ramos-Vara e colaboradores (2000) foi realizada nos cortes histológicos que nem sempre contemplam toda a lesão, enquanto no presente estudo o tamanho da lesão foi determinado por morfometria da peça durante a análise macroscópica. Um importante fator que deve ser considerado e que de certa forma explica a predominância de lesões menores na pele é a fácil visibilização da lesão pelo tutor o que resulta no diagnóstico precoce. Já as lesões em dígito ou cavidade oral por seu turno, na maior parte das vezes, são notadas quando o animal apresenta alguma sintomatologia relacionada a lesão, como claudicação e disfagia, respectivamente.

Segundo Bergin e colaboradores (2011), Gomes e colaboradores (2009) e Ramos-Vara e colaboradores (2000), o melanoma é a principal neoplasia maligna diagnosticada na cavidade

oral de cães, sendo a gengiva (mandibular e maxilar) e os lábios os sítios anatômicos mais afetados. Corroborando os dados obtidos neste levantamento, em que os locais mais acometidos na cavidade oral foram as gengivas maxilar e mandibular (42%), os lábios (19%) e o palato (12%). Nestas áreas, caso o animal não apresente a mucosa completamente pigmentada, normalmente se observa maior pigmentação pela melanose. No caso dos melanomas cutâneos, a maior parte das lesões estavam localizadas nas pálpebras (23%), incidência inversa a descrita por Camargo e colaboradores (2008), em que a pálpebra apareceu em segundo lugar de predileção para os melanomas.

Apesar de não ser considerado isoladamente um fator prognóstico independente para o melanoma, o ponto de corte para o índice mitótico (IM) possibilita a identificação do comportamento biológico com maior ou menor agressividade, $IM \geq 4$ e 3 ou $IM < 4$ e 3 , para os melanomas orais/dígitos e cutâneos, respectivamente (MEUTEN, 2017; SPANGLER e KASS, 2006). A maioria dos melanomas orais/dígitos deste levantamento apresentavam $IM \geq 4$ e a maioria dos melanomas cutâneos apresentavam $IM < 3$. Achado este que pode explicar a maior dimensão, a progressão e o comportamento mais agressivo das neoplasias localizadas na cavidade oral e dígitos, associado em algumas vezes a êmbolos neoplásicos em vasos linfáticos.

A ulceração foi um achado macroscópico e histopatológico frequente nos melanomas, independente da sua localização. Achado semelhante ao descritos na literatura, onde as lesões malignas são ulceradas (CAMARGO et al., 2008). Este achado se deve tanto a atividade juncional das células neoplásicas (infiltração para a epiderme e mucosa), causando a destruição das mesmas, por um crescimento excessivo da massa, como também por um traumatismo auto-infligido devido a boca e a pata serem mais propensas.

Nos melanomas localizados na cavidade oral e nos dígitos o padrão histológico predominante foram o misto e o epitelióide, com grande quantidade das compostas por células com pouca quantidade de melanina. Semelhante ao descrito na literatura para a maior frequência desses tipos histológicos nessas localizações, (GOLDSCHMIDT, 1985; ROLIM et al., 2012) e a sua associação com a baixa produção de melanina (ROLIM et al., 2012). Enquanto, os melanomas cutâneos apresentaram o predomínio do padrão misto com alta produção de melanina, semelhante ao descrito por Ramos-Vara e colaboradores (2000). Apesar do tipo histológico epitelióide e a baixa produção de melanina estarem relacionadas as lesões mais agressivas e associadas a outros achados que indicam pior prognóstico, aparentemente o tipo histológico e o grau de pigmentação da lesão não apresentam muita significância prognóstica para a espécie canina, mesmo a baixa produção de melanina indicar uma menor diferenciação dos melanócitos neoplásicos (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017).

Os melanomas podem desenvolver metástase para diferentes partes do corpo, em especial para linfonodos regionais e pulmões (GOLDSCHMIDT e GOLDSCHMIDT, 2017), similar ao observado nos quatro animais submetidos a necropsia com linfonodos e os pulmões afetados. Porém, na maioria dos casos a abordagem clínica se restringe apenas a retirada da lesão primária, mesmo após a obtenção do diagnóstico histopatológico de melanoma. Dos 117 casos avaliados, em apenas nove cães foi possível avaliar os linfonodos regionais. Nestes cães a grande maioria 7/9 (78%) apresentava metástase para linfonodos submandibulares, sítio de metástase descrito como de predileção para os melanomas orais (RAMOS-VARA et al., 2000).

A análise da curva de sobrevida com base na localização e tamanho dos tumores, demonstrou que os animais com menores taxas de sobrevida tinham melanomas maiores e localizados na cavidade oral e/ou dígitos. Corroborando a literatura preexistente, em que essas localizações são relacionadas ao pior prognóstico e menores taxas de sobrevida (GILLARD et al., 2014; SPANGLER e KASS 2006). Esses na maioria das vezes no momento do exérese já atingem dimensões maiores e maior progressão, devido ao pelame, a cor da pele e a localização anatômica (dígito e cavidade oral), que dificulta a detecção do tumor em estágios iniciais de crescimento.

O conhecimento do papel da resposta inflamatória associado ao tumor, em especial, dos linfócitos infiltrantes nos melanomas caninos ainda é incipiente e controverso. Desta forma, a análise da resposta imune do hospedeiro e a progressão da doença pode apontar uma possível associação e relação com fatores prognósticos e a sobrevida. No presente estudo, a avaliação morfológica das secções histológicas de melanoma revelou, grande quantidade de lesões sem resposta imune, em especial as cutâneas, mas, nos casos em que existia inflamação associada, a predominância do infiltrado leve e multifocal. A análise morfométrica, ratificou os resultados da morfologia e revelou ser o linfócito o tipo celular predominante, seguido dos macrófagos, independentemente da localização tumoral. Similar ao que foi observado neste estudo com cães, o melanoma cutâneo primário em seres humanos está frequentemente associado a ausência da resposta inflamatória ou a variados graus de infiltrados inflamatórios, compostos predominantemente de linfócitos (CLARK et al., 1989).

Outros estudos também demonstraram uma predominância de melanomas cutâneos em humanos sem resposta inflamatória associada. Mas, quando presente o TIL era multifocal/focal e relacionado ao melhor prognóstico e maior sobrevida (DAY et al., 1982; LARSEN e GRUDE, 1978; LEE et al., 2013). Entretanto, é importante ressaltar que esses resultados foram obtidos em tumores superficiais (com até 3,65 milímetros de espessura). Quando avaliado em tumores com maiores dimensões, a presença do TIL esteve relacionada a um pior prognóstico,

independente de outros fatores (tipo de célula tumoral, a pigmentação e atipia celular, o índice mitótico e a presença de ulceração) (LARSEN e GRUDE, 1978). Por outro lado, em estudo realizado por Day e colaboradores (1982), com 79 pacientes humanos diagnosticados com melanoma em estadiamento clínico I, com espessura maior ou igual a 3,65 mm, mostrou que a resposta linfocitária ausente no tumor foi uma das quatro variáveis que melhor prediziam o desenvolvimento de metástases ósseas ou viscerais. As outras três variáveis relacionadas a agressividade tumoral foram o tipo histológico, a localização da lesão no tronco e acometimento ou não dos linfonodos. No presente estudo, as lesões cutâneas em seu maior número não incitavam a resposta inflamatória e esta não teve relação com a sobrevida. Enquanto ausência do TIL nos tumores da cavidade oral / dígito esteve relacionada a uma menor sobrevida, quando comparados aqueles que apresentavam uma resposta imune antitumoral mesmo que leve.

No presente estudo, alguns parâmetros clínico-patológicos mostraram associação significativa com a presença do TIL, nos tumores orais/dígitos (tamanho da lesão, tipo histológico, produção de melanina e atipia nuclear) e cutâneos (tamanho, tipo histológico e índice mitótico). Naqueles animais em que foram obtidas informações do acompanhamento do paciente também foi observada associação significativa da sobrevida com a presença do infiltrado linfocítico. Esses achados enfatizam relatos anteriores que destacam a importância do monitoramento dessas características clínico-patológicas, a fim de compreender o comportamento biológico do melanoma e a sua possível influência do TIL nestes outros aspectos (SMEDLEY et al., 2011; SPANGLER e KASS, 2006). Estudos realizados com melanomas de humanos com tamanhos de até 4,0 mm na espessura de Breslow indicam a presença do infiltrado linfocítico, independente da intensidade, como um fator prognóstico independente para a ausência de metástases em linfonodos sentinelas (SINNAMON et al., 2018) e menor risco de morte de homens (THOMAS et al., 2013). Entretanto, alguns estudos não demonstram correlação entre o TIL e a sobrevida dos pacientes (BARNHILL et al., 1996; REDDY et al., 2014).

A ausência do infiltrado linfocítico, nos tumores localizados na cavidade oral/dígitos e de maiores dimensões, foram observados nos grupos de animais com menores taxas de sobrevida. Como a sobrevida em dias apresentou associação positiva com a presença dos linfócitos, é possível que o maior número de linfócitos infiltrantes nesses casos, seja representado por células T CD8⁺, relacionados ao melhor prognóstico, contudo, tal hipótese aventada não foi investigada no presente estudo, apesar de termos notado uma menor sobrevida nos tumores com uma maior população de células Treg (FoxP3⁺). Estes resultados ratificam a necessidade de estudos adicionais que possibilitem a melhor caracterização das subpopulações

específicas do TIL e ainda marcadores de ativação das células imunes, uma vez que o infiltrado pode ser constituído por células, que a depender do seu status de ativação, atuem com efeitos positivos ou negativos sobre a imunidade e crescimento tumoral (THOMAS et al., 2013; VIEIRA-FILHO et al., 2018).

Essas subpopulações do infiltrado inflamatório possuem diferenças na sua constituição quando comparados cães saudáveis com portadores de neoplasias malignas, predominando o aumento população de células $CD4^+FoxP3^+$ (Treg) nestes últimos (BILLER et al., 2007). Na avaliação imuno-histoquímica dos linfócitos do TIL nos melanomas orais / dígitos nota-se uma maior população de linfócitos ativadas $CD4^+$ e $FoxP3^+$ (Treg) nos tumores com maiores dimensões, mas, com baixo índice mitótico. Este aumento na população de células inflamatórias ocorre durante a progressão tumoral refletindo um aumento da antigenicidade tumoral, mas, sem, no entanto, representar uma supremacia de células ativadas com efetividade antitumoral (HUSSEIN et al., 2006). Uma vez que, as células Treg possuem forte impacto sobre a ativação e a proliferação de células $CD4^+$ e $CD8^+$, suprimindo a resposta imune tipo 1 (Th1 e Tc1) (HORIUCHI et al., 2010) e atuam de maneira seletiva ao antígeno tumoral, levando à sua ativação e/ou expansão clonal no microambiente tumoral e na circulação (AHMADAZDEH et al., 2019).

Na avaliação por citometria de fluxo do sangue e da massa neoplásica de cães com melanoma oral, Tominaga e colaboradores (2010) observaram uma maior população de células Treg na circulação e no tumor, indicando uma proliferação local, migração seletivas dessa subpopulação celular para o sítio neoplásico ou até mesmo uma conversão de células $CD4^+$ em $CD4^+FoxP3^+$ (Treg) promovida pelas células tumorais. Essa avaliação das subpopulações presentes na resposta inflamatória antitumoral também tem sido realizada em outros tipos de neoplasias com estudos translacionais. Estrela-Lima e colaboradores (2010), além de identificar o linfócito como principal tipo celular nos carcinomas mamários caninos, também sugeriram que o predomínio de linfócitos T $CD4^+$ está relacionado a evolução neoplásica, enquanto T $CD8^+$ está relacionado ao combate tumoral. Seguindo a mesma linha, Kim e colaboradores (2012) correlacionaram a maior população de células Treg com o alto grau histológico e a invasão linfática em cadelas com carcinomas mamários. Para estes autores, aparentemente a predominância de determinado subtipo de linfócito e suas interações com o microambiente tumoral contribuirá de forma marcante no papel na resposta inflamatória como um potente efetor contra o câncer ou estimulador do desenvolvimento tumoral.

A maior população de células Treg também foi observada nos tumores com baixo índice mitótico e maior expressão do MiTF pelas células tumorais. Essa relação das células Treg com

os tumores com maior expressão do MiTF se explica por este ser um importante componente na manutenção da linhagem melanocítica (VLCKOVA et al., 2018), levando a diferenciação celular e diminuição da proliferação (HARTMAN e CZYZ, 2015), e fazendo com que as células FoxP3⁺ reconheçam como antigenicamente normais, impedindo desta forma, a vigilância imunológica e o desenvolvimento da imunidade antitumoral (SUGIYAMA et al., 2013).

A avaliação da expressão de MiTF e p38 pode ter grande importância para o conhecimento da biologia das células neoplásicas, influenciado diretamente na diferenciação e proliferação dos melanócitos neoplásicos (PLOPER e De ROBERTS, 2015; SHEN et al., 2012). Células com baixa atividade do MiTF estão associadas a um fenótipo celular mais agressivo (HARTMAN e CZYZ, 2015), enquanto a p38 está associada a promoção da melanogênese e inibição do crescimento celular (SMALLEY e EISEN, 2000). De forma geral, o maior número de melanomas cutâneos expressa o MiTF e a p38, sendo estes resultados possíveis explicações para a maior diferenciação, menores dimensões e menor agressividade desses tumores (NISHIYA et al., 2016; SPANGLER e KASS, 2006), diferente dos melanomas localizados na cavidade oral / dígitos que tinham menor expressão nos tumores de maiores dimensões e com índice mitótico elevado, assim como a lesões primárias com focos metastáticos. Observações essas que reforçam a observação da maior sobrevida em animais que os melanomas expressavam essas proteínas. A expressão do MiTF também esteve associada aqueles tumores com a presença do TIL, independentemente da localização da lesão, o que indica que estes tumores apresentam uma maior diferenciação celular e maior capacidade de incitar uma resposta inflamatória (SHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2013). Entretanto, sem necessariamente ser composto por células ativadas ou com atividade antitumoral (LADÁNYI et al., 2011), tendo em vista que citocinas pró-inflamatórias estão associadas a supressão do MiTF e a quimiotaxia de células mieloides para o sítio tumoral (REINHARDT et al., 2017).

A p38 é relacionada não somente a indução da apoptose, como também a senescência das células neoplásicas (DIMRI et al., 1995), um indicador de resposta a tratamentos quimioterápicos (ZHANG et al., 2013). Assim como na expressão do MiTF, a p38 teve uma maior expressão nos tumores orais/dígitos menores e nos tumores cutâneos, nestes últimos principalmente nos de menores dimensões. O que explica uma supressão do crescimento tumoral nestes tumores com menores dimensões e comportamento biológico menor agressivo (SMALLEY e EISEN, 2000). Enquanto que a sua expressão foi predominante baixa nos tumores quando relacionamos ao índice mitótico, possivelmente pela capacidade de ativação de outras vias moleculares para o crescimento celular, como observado em linhagem celular de melanócitos malignos (M24met) *in vivo* (AGUIRRE-GHISO et al., 2001). Nota-se ainda, a

ausência do TIL nos tumores orais / dígitos que não expressão da proteína p38 nos, contrário aos tumores cutâneos nos quais a grande maioria dos tumores com TIL expressam a proteína. A maior expressão da p38 pelas células tumorais associada ao desenvolvimento da inflamação está relacionada a supressão do crescimento tumoral por uma maior produção de TNF- α pelas células inflamatórias (HUANG et al., 2010). Indicando que sua expressão nos tumores orais / dígitos sem resposta inflamatória pode não ser efetiva ou não ativada para o controle do ciclo celular, na sua ação supressora na sinalização de RAS ou por ativação de novas vias que levem a proliferação (IVANOV e RONAI, 2000; LOESCH e CHEN, 2016).

Ademais deve-se considerar a possibilidade do TIL associado aos tumores maiores ser anérgico ou senescente com perda dos seus efeitos antitumorais (HUSSEIN et al., 2006). Esses resultados reforçam não só o potencial do TIL e a expressão da MiTF e da p38 como possíveis fatores prognósticos nos melanomas caninos, mas também sinaliza a possibilidade da avaliação do TIL, como fator preditivo, influenciando na instituição de tratamentos, a exemplo da imunoterapia que já acontece na medicina.

8 CONCLUSÕES

Os melanomas caninos acometem principalmente animais mais velhos, machos e de raças que apresentam pelagem e/ou pele pigmentadas, possivelmente com maiores quantidades de eumelanina;

Os melanomas localizados no cavidade oral e dígitos, ao contrário dos tumores cutâneos, apresentavam o predomínio de características clínico-patológicas relacionadas ao pior prognóstico, como maiores dimensões, ulceração, maior índice mitótico, atipia nuclear, desenvolvimento de metástase e menor sobrevida.

A maioria dos melanomas caninos, independentemente da localização, não apresenta resposta inflamatória associada. Mas quando presente ela é discreta, com distribuição focal/multifocal, predominantemente linfocítica e associada a tumores com maiores dimensões.

A inflamação nos melanomas cutâneos está associada a maior expressão de MiTF e p38, o que indica que nos tumores menores, o TIL tem influência na diferenciação e menor progressão tumoral.

Nos melanomas orais / dígitos a menor expressão de MiTF e p38 está acompanhada por características clínico-patológicas associadas ao pior prognóstico, fortalecendo a ideia de neoplasias menos diferenciadas com menor ativação de vias apoptóticas.

Nos melanomas caninos localizados na cavidade oral e dígitos a presença do TIL esteve relacionada a maior sobrevida, enquanto a menor expressão do MiTF e p38 esteve relacionada a menores taxas de sobrevida nos melanomas caninos.

A população de células T CD4⁺ e FoxP3⁺ no TIL esteve relacionada a maior expressão do MiTF, indicando que apesar de um maior reconhecimento antigênico nesses tumores mais diferenciados, a resposta inflamatória pode ter papel supressor.

Apesar da resposta inflamatória linfocítica nos melanomas em cães está associada a fatores clínico-patológicos prognósticos. O seu papel ainda é controverso quando se observa o mesmo isoladamente, tendo em vista o envolvimento de outros tipos celulares no microambiente tumoral, como macrófagos e células NK. Desta forma, se faz necessária a imunofenotipagem dos linfócitos, com maior determinação dos subtipos celulares envolvidos e do seu estado de ativação.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Ativação dos linfócitos T. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012. p.203-224. ISBN: 978-85-352-4744-2.
- AGUIRRE-GHISO, J.A.; ESTRADA, Y.; LIU, D.; OSSOWSKI, L. ERK^{MAPK} activity as a determinant of tumor growth and dormancy; regulation by p38^{SAPK¹}. **Cancer Research**, v. 63, n. 7, p. 1684-1695, 2003.
- AGUIRRE-GHISO, J.A.; LIU, D.; MIGNATTI, A.; KOVALSKI, K.; OSSOWSKI, L. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy *in vivo*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 4, p. 863–879, 2001. doi: 10.1091/mbc.12.4.863.
- AHMADZADEH, M.; PASETTO, A.; JIA, L.; DENIGER, D.C.; STEVANOVIC, S.; ROBBINS, P.F.; ROSENBERG, S.A. Tumor-infiltrating human CD4+ regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. **Science Immunology**, v. 4, n. 31, eaao04310. doi: 10.1126/sciimmunol.aao4310.
- AIDA, S.; SONOBE, Y.; TANIMURA, H.; OIKAWA, N.; YHKI, M.; SAKAMOTO, H.; MIZUNO, T. MITF suppression improves the sensitivity of melanoma cells to a BRAF inhibitor. **Cancer Letters**, v. 409, p. 116-124, 2017. doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.008.
- ALTEMANI, A.M.A.M.; AMSTALDEN, E.M.I. Patologia Otorrinolaringológica. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2006. p.1136-1175. ISBN: 85-2771-222-9.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.
- BAHNASSY, A.A.; ZEKRI, A.R.N.; EL-HOUSSINI, S.; EL-SHEHABY, A.M.R.; MAHMOUD, M.R.; ABDALLAH, S.; EL-SERAFI, M. Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. **BMC Gastroenterology**, v.4, n.22, 12p., 2004. doi: 10.1186/1471-230X-4-22.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **Lancet**, v.357, p.539-545, 2001. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0.
- BANDARCHI, B.; JABBARI, C.A.; VEDADI, A.; NAVAB, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 8, p.644-648, 23 mar. 2013. doi:10.1136/jclinpath-2013-201471.
- BARNHILL, R.L.; FINE, J.A.; ROUSH, G.G.; BERWICK, M. Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. **Cancer**, v. 78, n. 3, p. 427-432, 1996. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<427::AID-CNCR8>3.0.CO;2-G.

BELLEI, B.; MARESCA, V.; FLORI, E.; PITISCI, A.; LARUE, L.; PICARDO, M. p38 regulates pigmentation via proteasomal degradation of tyrosinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7288-7299, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.070573.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor-microenvironment interaction. **Breast Cancer Research**, v. 31, p. 31-36, 2003. doi: 10.1186/bcr554

BENEDITO, E.; JIMEÑEZ-CERVANTES, C.; PEREZ, D.; CUBILANA, J.D.; SOLANO, F.; JIMEÑEZ-CERVANTES, J.; MEYER ZUM GOTTESBERGE, A.M.; LONZANO, J.A.; GARCIA BORRON, J.C. Melanin formation in the inner ear is catalyzed by a new tyrosine hydroxylase kinetically and structurally different from tyrosinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 59–72, 1997. doi: 10.1016/S0304-4165(97)00011-1.

BERGIN, I.L.; SMEDLEY, R.C.; ESPLIN, D.G.; SPANGLES, W.L; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki-67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48 n.1, p. 41-53, 2011. doi: 10.1177/0300985810388947.

BERGMAN, P.J. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007. doi: 10.1055/j.ctsap.2007.03.004.

BILLER, B.J.; ELMSLIE, R.E.; BURNETT, R.C.; AVERY, A.C.; DOW, S.W. Use of FoxP3 expression to identify regulatory T cells in healthy dogs and dogs with cancer. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 116, p. 67-78, 2007. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.12.002.

BLANKENSTEIN, T. The role of inflammation in tumor growth and tumor suppression. **Cancer and Inflammation**. In: Novartis Foundation Symposium, p. 205-214, 2004.

BOISSY, R.E. Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. **Experimental Dermatology**, v. 12, n. 2, p. 5–12, 2003.

BORTNER C.D.; CIDLOWSKI, J.A. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.42, p.259-281, 2002. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.083101.143836.

BOSTRÖM, P.; SÖDERSTRÖM, M.; PALOKANGAS, T.; VAHLBERG, T.; COLLAN, Y.; CARPEN, O.; HIRSIMÄKI, P. Analysis of cyclins A, B1, D1 and E in breast cancer in relation to tumor grade and other prognostic factors. **BMC Research Notes**, v.2, n.140, 8p., 2009. doi: 10.1186/1756-0500-2-140.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo – Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2000, p.149-193. ISBN: 85-2770-611-3.

BRETONES, G.; DELGADO, M.D.; LEÓN, J. Myc and cell cycle control. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849, p. 506-516, 2015. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013.

BUCHBINDER, E.I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. **American Journal of Oncology**, v. 39, p. 98-106, 2016. doi: 10.1097/COC.0000000000000239.

BURNS, M.; O'DONNELL, A.; PUZANOV, I. Pembrolizumab for the treatment of advanced melanoma. **Expert Open Orphan Drugs**, v. 4, n. 8, e867873, 2016. doi: 10.1080/21678707.2016.1191348.

BUSAM, K.J.; HESTER, K.; CHARLES, C.; SACHS, D.L.; ANTONESCU, C.R.; GONZALEZ, S.; HALPERN, A.C. Detection of clinically amelanotic malignant melanoma and assessment of its margins by in vivo confocal scanning laser microscopy. **Archives of Dermatology**, v.137, p. 923-929, 2001.

CAMARGO, L.P.; CONCEIÇÃO, L.G.; COSTA, P.R.S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 138-152, 2008. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26711.

CAMPAGNE, C.; JULÉ, S.; ALLEAUME, C.; BERNEX, F.; EZAGAL, J.; CHÂTEAU-JOUBERT, S.; ESTRADA, M.; AUBIN-HOUZELSTEINS, G.; PANTHIER, J.J.; EDIDY, G. Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a potential biological marker. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1083-1090, 2013. doi: 10.1177/0300985813490754.

CANATTO, B.D.; SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; MENDES, M.C.N.C.; PARANHOS, N.T.; DIAS, R.A. Demographic characterization of supervised dog and cat populations in São Paulo city, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 6, p. 1515-1523, 2012.

CARREIRA, S.; GOODALL, J.; DENAT, L.; ROFRIGUEZ, M.; NUCIFORO, P.; HOEK, K.S.; TESTORI, A.; LARUE, L.; GODING, C.R. Mitf regulation of Dlx1 controls melanoma proliferation and invasiveness. **Genes & Development**, v. 20, n. 24, p. 3426-3429. doi: 10.1101/gad.406406.

CHELI, Y.; GIULIANO, S.; FENOUILLE, N.; ALLEGRA, M.; HOFMAN, V.; HOFMAN, P.; BAHADORAN, P.; LACOUR, J-P.; TARTARE-DECKERT, S.; BERTOLOTTO, C.; BALLOTTI, R. Hypoxia and MITF control metastatic behaviour in mouse and human melanoma cells. **Oncogene**, v. 31, n. 19, p. 2461-2470, 2012. doi: 10.1038/onc.2011.425.

CHELI, Y.; OHANNA, M.; BALLOTTI, R.; BERTOLOTTO, C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 23, n. 1, p. 27-40, 2010. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x.

CHIARUTINI, G.; MELE, S.; OPZOOMER, J.; CRESCIOLI, S.; ILIEVA, K.M.; LACY, K.E.; KARAGIANNIS, S.N. B cells and the humoral response in melanoma: the overlooked players of the tumor microenvironment. **Oncoimmunology**, v. 6, n.4, e1294296, 2017. doi: 10.1080/2162402x.2017.1294296.

CLARK, W.H.Jr.; ELDER, D.E.; GUERRY, D.; BRAITMAN, L.E.; TROCK, B.J.; SCHULTZ, D.; SYNNESTVEDT, M.; HALPERM, A. Model predicting survival in stage I

melanoma based on tumor progression. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, n. 24, p. 1893-1904, 1989. doi: 10.1093/jnci/81.24.1893.

CLARK, W.H.Jr.; FROM, L.; BERNARDINO, E.A.; MIHM, M.C. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, p. 705-726, 1969.

CLEMENTE, C.G.; MIHM, M.C.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; COLLINI, P.; CASCINELLI, N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1303-1310, 1996.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, p.860-867, 2002. doi: 10.1038/nature01322.

DAY, C.L.Jr.; LEW, R.A.; MIHM, M.C.Jr.; SOBER, A.J.; HARRIS, M.N.; KOPF, A.W.; FITZPATRICK, T.B.; HARRIS, T.J.; GOLOM, F.M.; POSTEL, A.; HENNESSEY, P.; GUMPORT, S.L.; RAKER, J.W.; MALT, R.A.; COSIMI, A.B.; WOOD, W.C.; ROSES, D.F.; GORSTEIN, F.; RIGEL, D.; FRIEDMAN, R.J.; MINTZIS, M.M.; GRIER, R.W. A multivariate analysis of prognostic factors for melanoma patients with lesions greater than or equal to 3.65 mm in thickness. The importance of revealing alternative Cox models. **Annals of Surgery**, v. 195, n. 1, p. 44-49, 1982.

DIMRI, G.P.; LEE, X.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLY, C.; MEDRANO, E.E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M.; CAMPISI, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, n. 20, p. 9363-9367, 1995.

EKHOLM, S.V.; REED, S.I. Regulation of G1 cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, n. 6, p.676-684, 2000.

EIRÓ, N.; VIZOSO, F. Inflammation and cancer. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v.4, n.3, p.62-72, 2012. doi: 10.4240/wjgs.v4.i3.62.

ERDAG, G.; SCHAEFER, J.T.; SMOLKIN, M.E.; DEACON, D.H.; SHEA, S.M.; DENGEL, L.T.; PATTERSON, J.W.; SLINGLUFF Jr, C.L. Immunotype and immunohistologic characteristics of tumor infiltrating immune cells are associated with clinical outcome in metastatic melanoma. **Cancer Research**, v.72, n. 5, p. 1070-1080, 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3218.

ERICKSON, C.A. From the crest to the periphery: control of pigment cell migration and lineage segregation. **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 5, p. 336-347, 1993. doi: 10.1111/j.1600-0749.1993.tb00611.x.

ERRENI, M.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. **Cancer Microenvironment**, v. 4, p. 141-154, 2011. doi: 10.1007/s12307-010-0052-5.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.; COSTA-NETO, J.M.; RIBEIRO, L.G.; DAMASCENO, K.A.; D'ASSIS, M.J.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO,

- A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Understanding of the immunological heterogeneity of canine mammary carcinomas to provide immunophenotypic features of circulating leukocytes as clinically relevant prognostic biomarkers. **Breast Cancer Research**, v. 131, n. 3, p. 751-763, 2012. doi: 10.1007/s10549-011-1452-z.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.; SOARES, R.P.; RIBEIRO, L.G.; DAMASCENO, K.A.; COSTA, A.T.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; CASSALI, G.D. Plasma biomarkers profile of female dogs with mammary carcinoma and its association with clinical and pathological features. **Veterinary Comparative Oncology**, v. 14, p. 88-100, 2016. doi: 10.1111/vco.12070.
- ESTRELA-LIMA, A.; ARAÚJO, M.S.; COSTA-NETO, J.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S.M.; CARDOSO, S.V.; MARTINS-FILHO, O.A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BMC Cancer**, v. 10, n. 256, 2010. doi: 10.1186/1471-2407-10-256.
- FOX M.D.; BILLINGS, S.D.; GLEASON, B.C.; MOORE, J.; THOMAS, A.B.; SHEA, C.R.; VICTOR, T.A.; CIBULL, T.L. Expression of MITF may be helpful in differentiating cellular neurothekeoma from plexiform fibrohistiocytic tumor (histiocytoid predominant) in a partial biopsy specimen. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 34, n. 2, p. 157-160, 2012. doi: 10.1097/DAD.0b013e3182286a03.
- GALEA, C.A.; WANG, Y.; SIVAKOLUNDU, S.G.; KRIWACKI, R.W. Regulation of cell division by intrinsically unstructured proteins; intrinsic flexibility, modularity and signaling conduits. **Biochemistry**, v.47, n.29, p.7598-7609, 2008. doi: 10.1021/bi8006803.
- GARRAWAY, L.A.; WIDLUND, H.R.; RUBIN, M.A.; GETZ, G.; BERGER, A.J.; RAMASWAMY, S.; BEROUKHIM, R.; MILNER, D.A.; GRANTER, S.R.; DU, J.; LEE, C.; WAGNER, S.N.; LI, C.; GOLUT, T.R.; RIMM, D.L.; MEYERSON, M.L.; FISHER, D.E.; SELLERS, W.R. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. **Nature**, v. 436, n. 7047, p. 117-122, 2005. doi: 10.1038/nature03664.
- GATA, V.A.; LISENCU, C.I.; VLAD, C.I.; PICIU, D.; IRIMIE, A.; ACHIMAS-CADARIU, P. Tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic factor in malignant melanoma. Review of the literature. **Journal of B.U.ON**, v. 22, n. 3, p. 592-598, 2017.
- GILLARD, M.; CADIEU, E.; De BRITO, C.; ABADIE, J.; VERGIER, B.; DEVAUCHELLE, P.; DEGORCE, F.; DRÉANO, S.; PRIMOT, A.; DORSO, L.; LAGADIC, M.; GALIBERT, F.; HÉDAN, B.; GALIBERT, M.D.; ANDRÉ, C. 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. doi: 10.1111/pcmr.12170.
- GOLDSCHMIDT, M.H. Benign and malignant melanocytic neoplasms of domestic animals. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 7, p. 203-212, 1985.
- GOLDSCHMIDT, M.H.; GOLDSCHMIDT, K.H. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Iowa State: Wiley Blackwell, 2017. p.88-141. ISBN: 978-0-813-82179-5.

GOLDSCHMIDT; M.H.; HENDRICK M.J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4. ed. Iowa State: Wiley Blackwell, 2002. p.44-117. ISBN: 978-0-813-82652-3.

GOMES, C.; OLIVEIRA, L.O.; ELIEZEIRE, M.B.; OLIVEIRA, M.B.; OLIVEIRA, R.T.; CONTESINI, E.A. Avaliação epidemiológica de cães com neoplasias orais atendidos no hospital de clínicas veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 10, n. 3, p. 835-839, 2009.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. Tumores Melanocíticos. In: GROSS, T.L.; IHRKE, P.J.; WALDER, E.J.; AFFOLTER, V.K. **Doenças de Pele do Cão e do Gato: Diagnóstico Clínico e Histopatológico**. 2. ed. São Paulo, SP: Editora Roca, 2009. p.797-820. ISBN: 9788572418058.

GUEDES, R.M.C.; BROWN, C.C.; SIQUEIRA, J.L.; REIS, JR, J.L. Sistema Digestório. In: SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C. **Patologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Roca, 2016. p.87-180. 1v. ISBN: 9788527728706.

HAQ, R.; FISHER, D.E. Biology and clinical relevance of the microphthalmia family of transcription factors in human câncer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 25, p. 3474–3482, 2011. doi: 10.1200/JCO.2010.32.6223.

HARTMAN, M.L.; CZYZ, M. Pro-survival role of MITF in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, p. 352-358, 2015. doi: 10.1038/jid.2014.319.

HEMESATH, T.J.; STEINGRÍMSSON, E.; MCGILL, G.; HANSEN, M.J.; VAUGHT, J.; HODGKINSON, C.A.; ARNHEITER, H.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; FISHER, D.E. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. **Genes & Development**, v. 8, n. 22, p. 2770–2780, 1994. doi: 10.1101/gad.8.22.2770.

HERNANDEZ, B.; WEI, B.R.; MICHAEL, H.T.; MERLINO, G.; SIMPSON, R.M. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 2018. doi: 10.3390/ijms19020394.

HEYS, S.D.; STEWART, K.N.; MCKENZIE, E.J.; MILLER, I.D.; WONG, S.Y.; SELLAR, G.; REES, A.J. Characterization of tumor-infiltrating macrophages: impact on response and survival in patients receiving primary chemotherapy for breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 135, n. 2, p. 539-548, 2012. doi: 10.1007/s10549-012-2190-6

HORIUCHI, Y.; TOMINAGA, M.; ICHIKAWA, M.; YAMASHITA, M.; OKANO, K.; JIKUMARU, Y.; NARIAI, Y.; NAKAJIMA, Y.; KUWABARA, M.; YUKAWA, M. Relationship between regulatory and type 1 T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Microbiology and Immunology**, v. 54, p. 152-159, 2010. doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00194.x.

HSIAO, J.J.; FISHER, D.E. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 563, p. 28-34, 2014. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.019.

HUANG, P.; HAN, J.; HUI, L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. **Protein & Cell**, v. 1, n. 3, p. 218-226, 2010. doi: 10.1007/s13238-010-0019-9.

HUI, L.; BAKIRI, L.; MAIRHORFER, A.; SCHWEIFER, N.; HASLINGER, C.; KENNER, L.; KOMNENOVIC, V.; SCHEUCH, H.; BEUG, H.; WAGNER, E.F. p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 741-749, 2007. doi: 10.1038/ng2033.

HUSSEIN, M.R.; ELSERS, D.A.H.; FADEL, S.A.; OMAR, A-E.M. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 316-324, 2006. doi: 10.1136/jcp.2005.028860.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemistry of mixed melanogenesis – pivotal roles of dopaquinone. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, p. 582-592, 2008. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.

IVANOV, V.N.; RONAI, Z. p38 protects human melanoma cells from UV-induced apoptosis through down-regulation of NF-kappaB activity and Fas expression. **Oncogene**, v. 19, n. 26, p. 3003–3012, 2000. doi: 10.1038/sj.onc.1203602.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.39, p.295-312, 1999. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.39.1.295

KASHANI-SABET, M. Molecular markers in melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 170, n. 1, p. 31-35, 2014. doi: 10.1111/bjd.12493.

KATSUNO, Y.; SUZUKI, A.; SUGIMURA, K.; OKUMURA, K.; ZINELDEEN, D.H.; SHIMADA, M.; NIIDA, H.; MIZUNO, T.; HANAOKA, F.; NAKANISHI, M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.106, n.9, p.3184-3189, 2009. doi: 10.1073/pnas.0809350106

KAWADA, M.; USAMI, I.; OHBA, S.I.; SOMENO, T.; KIM, J.W.; HAYAKAWA, Y.; NOSE, K.; ISHIZUKA, M. Hygrolidin induced p21 expression and abrogates cell cycle progression at G1 and S phase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.298, n.1, p.178-183, 2002.

KIM, J.H.; HUR, J.H.; LEE, S.M.; IM, K.S.; KIM, N.H.; SUR, J.H. Correlation of Foxp3 positive regulatory T cells with prognostic factors in canine mammary carcinomas. **The Veterinary Journal**, v. 193, p. 222-227, 2012. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.10.022.

KING, K.L.; CIDLOWSKI, J.A. Cell cycle regulation and apoptosis. **Annual Review of Physiology**, v.60, p.601-617, 1998. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.601

- KING, R.; GOOGE, P.B.; WEILBAECHER, K.N.; MIHM, J.R.M.C.; FISHER, D.E. Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 25, n. 1, p. 51–57, 2001.
- KOBAYASHI, T.; URABE, K.; WINDER, A.; JIMEÍNEZ-CERVANTES, C.; IMOKAWA, G.; BREWINGTON, T.; SOLANO, F.; GARCHA-BORROÍN, J.C.; HEARING, V.J. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanina biosynthesis. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 24, p. 5818-5825, 1994.
- KUSEWITT, D.F.; RUSH L.J. Neoplasia e Biologia Tumoral. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4. ed. São Paulo, SP: Editora Elsevier, 2009, p.253-297. ISBN: 8535246223, 9788535246223.
- LADÁNYI, A.; KISS, J.; MOHOS, A.; SOMLAI, B.; LISZKAY, G.; GILDE, K.; FEJOS, Z.; GAUDI, I.; DOBOS, J.; TÍMÁR, J. Prognostic impact of B-cell density on cutaneous melanoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60, p. 1728-1738, 2011. doi: 10.1007/s00262-011-1071-x.
- LADÁNYI, A.; SOMLAI, B.; GILDE, K.; FEJOS, Z.; GAUDI, I.; TÍMÁR, J. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 521-530, 2004.
- LAND, E.J.; RAMSDEN, C.A.; RILEY, P.A. Pulse radiolysis studies of ortho-quinone chemistry relevant to melanogenesis. **ESP Conference on Photoprotection**, v. 64, n. 2, p. 123–135, 2001. doi: 10.1016/S1011-1344(01)00220-2.
- LARSEN, T.E.; GRUDE, T.H. A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. The relation between the tumour-associated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A**, v. 86A, n. 6, p. 523-530, 1978.
- LAZAR, A.J.F.; MURPHY, G.F. A Pele. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. **Robbins & Cotran Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2016. p.1167-1206. ISBN: 9788535281637.
- LEE, S.J.; LIM, H.J.; CHOI, Y.H.; CHANG, Y.H.; LEE, W.J.; KIM, D.W.; YOON, G.S. The clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes and microscopic satellites in acral melanoma in a Korean population. **Annals of Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 60-66, 2013. doi: 10.5021/ad.2013.25.1.61.
- LEE, B.; SAMDHU, S.; McARTHUR, G. Cell cycle control as a promising target in melanoma. **Current Opinion Oncology**, v. 27, p. 141-150, 2015. doi: 10.1097/CCO.0000000000000159.
- LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D.E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 406–414, 2006. doi: 10.1016/j.molmed.2006.07.008.

LEVY, C.; KHALED, M.; ROBINSON, K.C.; VEGUILLA, R.A.; CHEN, P-H.; YOKOYAMA, S.; MAKINO, E.; LU, J.; LARUE, L.; BEERMANN, F.; CHIN, L.; BOSENBERG, M.; SONG, J.S. Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. **Cell**, v. 141, p. 994-1005, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.004.

LIU, CH.; LIN, CH.; LIN, MD.; TSAI, MJ.; CHEN, WT.; CHAI, CY.; HUANG, YC. TSAI, KB. Melanin bleaching with dilute hydrogen peroxide: a simple and rapid method. **Applied Immunohistochemistry e molecular morphology**, v. 21, n. 3, p. 275-279, 2013. doi: 10.1097/PAI.0b013e826d81db.

LIU, CH.; LIN, CH.; TSAI, MJ.; CHEN, YH.; YANG, SF.; TSAI, KB. Melanin bleaching with warm hydrogen peroxide and integrated immunohistochemical analysis: an automated plataform. **International Journal of Surgical Pathology**, v. 0, p. 1-7, 2018. doi: 10.1177/1066896918756998.

LOESCH, M.; CHEN, G. The p38 MAPK stress pathway as a tumor supressor or more? **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 3581-3593, 2016.

LOTAYEF, M.; WILSON, G.D.; DALEY, F.M.; AWWAD, H.K.; SHOUMAN, T. Aberrant expression of cyclin A in head and neck cancer. **British Journal of Cancer**, v.83, n.1, p.30-34, 2000. doi: 10.1054/bjoc.2000.1193.

MACHADO, G.A.C.; FONTES, T.N.; LARANJEIRA, D.F.; ESTRELA-LIMA, A.; MOREIRA, E.L.T.; RIBEIRO, L.S.; PINTO, M.P.R.; PEIXOTO, T.C. Incidende of skin tumors in dogs in Salvador, Bahia state, Brazil (2007-2016). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.11, p. 2139-2145, 2018. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5686.

MANSOUR, S.; MATTEN, W.T.; HERMANN, A.S.; CANDIA, J.M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE G.F.; AHN, N.G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, v. 265, n. 5174, p. 966–970, 1994.

MARTINEZ-RODIGUEZ, M.; THOMPSON, A.K.; MONTEAGUDO, C. A significant percentage of CD20-positive TILs correlates with poor prognosis in patients with primary cutaneous malignant melanoma. **Histopatology**, v. 65, p. 726-728, 2014. doi: 10.1111/his.12437.

MARX, J. Inflammation and cancer: the link grows stronger. **Science**, v. 306, p. 966-968, 2004.

MEUTEN, D.J. Appendix: Diagnostic Schemes and Algorithms. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5. ed. Iowa State: Wiley Blackwell, 2017. p.942-978. ISBN: 978-0-813-82179-5.

MEYRER, B.; BIANCHI, S.P.; PAVARINI, S.P.; GERARDI, D.G. Congenital cutaneous melanoma in a dog. **Veterinary Dermatology**, v. 28, p. 228-e56, 2017. doi: 10.1111/vde.12391.

MIHM, M.C.; MULÉ, J.J. Reflections on the histopathology of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma and the host imune response. **Cancer Immunology Research**, v. 3, n. 8, p. 827-835, 2015. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0143.

MIYARA, M.; YOSHIDA, Y.; KITO, A.; SHIMA, T.; WING, K.; NIWA, A.; PARIZOT, C.; TAFLIN, C.; HEIKE, T.; VALEYRE, D.; MATHIAN, A.; NAKAHATA, T.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M.; AMOURA, Z.; GOROCHOV, G.; SAKAGUCHI, S.; Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, v. 30, p. 899-911, 2009. doi: 10.1016/j.immuni.2009.03.019.

MOCELLIN, S.; LENS, M.B.; PASQUALI, S.; PELATI, P.; CHIARION-SILENI, V. Interferon alpha for the adjuvante treatment of cutaneous melanoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 6, p. 1-77, 2013. doi: 10.1002/14651858.CD008955.pub2.

MOH, M.C.; ZHANG, T.; LEE, L.H.; SHEN, S. Expression of hepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells. **Carcinogenesis**, v.29, n.12, p.2298-2305, 2008.

MOURIAUX, F.; VINCENT, S.; KHERROUCHE, Z.; MAURAGE, C-A.; PLANQUE, N.; MONTÉ, D.; LABALETTE, P.; SAULE, S. Microphthalmia transcription factor in posterior uveal melanomas. **Experimental Eye Research**, v. 76, p. 653-661, 2003. doi: 10.1016/S0014-4835(03)00082-4.

NAKATANI, F.; TANAKA, K. MATSUMOTO, Y.; MATSUNOBU, T.; SAKIMURA, R.; IWAMOTO, Y. Identification of p21 gene as a direct target of ewe-flii fusion protein in ewing's sarcoma cells. In: **Annual Meeting**, 47, 2001, San Francisco, California: Osteopaedic Research Society. p.0305.

NAJEM, A.; KRAYEM, M.; SALÈS, F.; HUSSEIN, N.; BADRAN, B.; ROBERT, C.; AWADA, A.; JOURNE, F.; GHANEM, G.E. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. **European Journal of Cancer**, n.83, p. 154-165, 2017. doi: 10.1016/j.ejca.2017.06.033.

NAM, E.J.; KIM, Y.T. Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v.18, n. 6, p.1169-1182, 2008. doi: 10.1111/j.1525-1438.2008.01191.x.

NELSON, B.H. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 4977-4982, 2010. doi: 10.4049/j.immunol.1001323.

NGUYEN, N.T.; FISHER, D.E. MITF and UV responses in skin: from pigmentation to addiction. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 32p., 2018. doi: 10.1111/pcmr.12726.

NISHIYA, A.T.; MASSOCO, C.O.; FELIZZOLA, C.R.; PERLMANN, E.; BATSCHEWSKI, K.; TEDARDI, M.V.; GARCIA, J.S.; MENDONÇA, P.P.; TEIXEIRA, T.F.; ZAIDAN DAGLI, M.L. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 7, 2016. doi: 10.3390/vetsci3010007.

NOGUCHI, S.; KUMAZAKI, M.; MORI, T.; BABA, K.; OKUDA, M.; MIZUNO, T.; AKAO, Y. Analysis of microRNA-203 function in CREB/MITF/RAB27 a pathway: comparison between canine and human melanoma cells. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.14, n. 4, p. 384-394, 2014. doi: 10.1111/vco.12118.

NORLUND, J.J. The lives of pigment cells. **Dermatologic Clinics**, v. 4, n. 3, p. 407-418, 1986.

OHSIE, S.J.; SARANTOPOULOS, G.P.; COCHRAN, A.J.; BINDER, S.W. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p.433-444, 2008. doi: 10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x.

OKAMOTO, S.; SAKAI, M.; UCHIDA, J.; SAITO, H. 5-fluoracil induces apoptotic cell death with G2 phase arrest in human breast cancer grafted in nude mice. **Anticancer Research**, v.16, n. 5A, p.2699-2704, 1996.

OLIVEIRA, I.O.; JÚNIOR, H.L.A. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, RJ, v.78, n. 3, p. 331-343, 2003.

ONO, M. Review Article Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. **Cancer Science**, v. 99, n.8, p. 1501–1506, 2008.

PAGÈS, F.; GALON, J.; DIEU-NOSJEAN, M-C.; TARTOUR, E.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; FRIDMAN, W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic fator that should not be ignored. **Oncogene**, v. 29, p. 1093-1102, 2010. doi: 10.1038/onc.2009.416.

PARK, H.Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 9, p. 1493–1506, 2009. doi: 10.1007/s00018-009-8703-8.

PATNAIK, A.K.; LIEBERMAN, P.H.; ERLANDSON, R.A.; MacEWEN, E.G.; HURVITZ, A.I. A clinicopathologic and ultrastructural study of undifferentiated malignant tumors of the oral cavity in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 2, p. 170-175, 1986. doi: 10.1177/030098588602300210.

PELÚZIO, M.C.G.; VOLP, A.C.P.; QUEIROZ, I.C.; BRITO, C.J.; MIRANDA, T.C. As proteínas supressoras em neoplasias malignas – conhecendo seu papel. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Porto Alegre, v. 21, n. 3, p.233-238, 2006.

PINES, J. Cyclins, CDKs and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 6, n. 2, p. 63-72, 1995. doi: 10.1006/scbi.1995.0009.

PLOPER, D.; De ROBERTIS, E.M. The MITF Family of transcription factors: role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling, and oncogenesis. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 36-43, 2015. doi: 10.1016/j.phrs.2015.04.006.

POIKONEN, P.; SJÖSTRÖM, J.; AMINI, R.M.; VILLMAN, K.; AHLGREN, J.; BLOMQVIST, C. Cyclin A as a marker for prognostic and chemotherapy response in advanced breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.93, p.515-519, 2005. doi: 10.1038/sj.bjc.6602735

- PRIETO, V.G., SHEA, C.R. Immunohistochemical of melanocytic proliferations. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.135, n. 7, p. 853-859, 2011. doi: 10.1043/2009-0717-RAR.1.
- PRIETO, P.A.; YANG, J.C.; SHERRY, R.M.; HUGHES, M.S.; KAMMULA, U.S.; WHITE, D.E.; LEVY, C.L.; ROSENBERG, S.A.; PHAN, G.Q. CTLA-4 blockade with Ipilimumab: long-term follow-up of 177 patients with metastatic melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 7, p. 2039-2047, 2012. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1823.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. **AFIP Laboratory Methods in Histotechnology**. Washington: Am. Registry of Pathology, 1992, 278p.
- PRZEZDZIECKI, R.; CZOPOWICZ, M.; SAPIERZYNSKI, R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v.44, n. 4, p.597-604, 2015. doi: 10.1111/vcp.12292.
- RALAINIRINA, N.; POLI, A.; MICHEL, T.; POOS, L.; ANDRÈS, E.; HENTGES, F.; ZIMMER, J. Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 144-153, 2007. doi: 10.1189/jlb.0606409.
- RAMOS-VARA, J.A.; BEISSENHERZ, E.; MILLER, M.A.; JOHNSON, G.C.; PACE, L.W.; FARD, A.; KOTTLER, S.J. 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. doi: 10.1354/vp.37-6-597.
- REDDY, S.S.; BOUKOVALAS, S.; BARNICA, V.; ZHU, F.; WU, H.; FARMA, J.M. Tumor infiltrating lymphocytes and their role as a prognostic indicator for melanoma. **The Journal of Surgery**, v. 2, n. 7, 2014.
- REINHARDT, J.; LANDSBERG, J.; SCHIMD-BURK, J.L.; RAMIS, B.B.; BALD, T.; GLODDE, N.; LOPEZ-RAMOS, D.; YOUNG, A.; NGIOW, S.F.; NETTERSHEIM, D.; SCHORLE, H.; QUAST, T.; KOLANUS, W.; SCHADENDORF, D.; LONG, G.V.; MADORE, J.; SCOLYER, R.A.; RIBAS, A.; SMYTH, M.J.; TUMEH, P.C.; TÜTING, T.; HÖLZEL, M. MAPK signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy. **Cancer Research**, v. 77, n. 17, p. 4697-4709, 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0395.
- RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. A família do p53: aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.2, p.179-184, 2003. doi: 10.1590/S1676-24442003000200014
- RIESENBERG, S.; GROETCHEN, A.; SIDDAWAY, R.; BALD, T.; REINHARDT, J.; SMOVA, D.; KOHLMAYER, J.; RENN, M.; PHUNG, B.; AYMANS, P.; SCHIMDT, T.; HORNUNG, V.; DAVIDSON, I.; GODING, C.R.; JÖNSON, G.; LANDSBERG, J.; TÜTING, T.; HÖLZEL, M. MiTF and c-Jun antagonismo interconnects melanoma dedifferentiation with pro-inflammatory cytokine responsiveness and myeloid cell recruitment. **Nature Communications**, v. 6, p. 8755, 2015. doi: 10.1038/ncomms9755.
- RODRÍGUEZ, G.; VARGAS, E.J.; ABAÚNZA, M.C.; DÍAZ QUIJANO, D.M.; MELO-URIBE, M. Immunohistochemical identification of nail matrix melanocytes. **Journal of the**

European Academy of Dermatology and Venereology, v. 32, n. 9, p. 1602-1607, 2018. doi: 10.1111/jdv.14925.

ROLIM, V.M.; CASAGRANDE, R.A.; WATANABE, T.T.; WOUTERS, A.T.; WOUTERS, F.; SONNE, L.; DRIEMEIER, D. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Santa Maria, v. 32, n. 4, p. 340-346, 2012. doi: 10.1590/S0100-736X2012000400011.

RUFFELL, B.; AU, A.; RUGO, H. S.; ESSERMAN, L.J.; HWANG, E.S.; COUSSENS, L.M. Leukocyte composition of human breast cancer. **PNAS**, v.109, n. 8, p.2796-2801, 2012. doi: 10.1073/pnas.1104303108.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; COSTANTINO, C.; HAFLER, D.A. FoxP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nature**, v. 10, p. 490-500, 2010. doi: 10.1038/nri.2785.

SAKURAI, T.; HE, G.; MATSUZAWA, A.; YU, G-Y.; MAEDA, S.; HARDIMAN, G.; KARIN, M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 α release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 14, n. 2, p. 156-165, 2008. doi: 10.1016/j.ccr.2008.06.016.

SALAMA, P.; PHILLIPS, M.; GRIEU, F.; MORRIS, M.; ZEPS, N.; JOSEPH, D.; PLATELL, C.; IACOPETTA, B. Tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory cells show Strong prognostic significance in colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 2, p. 186-192, 2009. doi: 10.1200/JCO.2008.18.7229.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2. ed. Belo Horizonte, MG: FEPMVZ, 2002. 265p.

SHAH, M.; BHUMIK, A.; GOEL, V.; DEWING, A.; BREIWIESER, W.; KLUGER, H.; KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; DeHART, J.; LAU, E.; KALLENBERG, D.M.; JEONG, H.; EROSHKIN, A.; BENNETT, D.C.; CHIN, L.; BOSENBERG, M.; JONES, N.; RONAI, Z.A. A role for ATF2 in regulation of MITF and melanoma development. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 2, e1001258, 2010. doi: 10.1371/journal.pgen.1001258.

SHENG, L.; SHEN, Q.; HUANG, K.; LIU, G.; ZHAO, J.; XU, W.; LIU, Y.; LI, W.; LI, Y. Upregulation of β 3-adrenergic receptors contributes to atrial structural remodeling in rapid pacing induced atrial fibrillation canines. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 372-381, 2012. doi: 10.1159/000339031.

SHEN, T.; HEO, S-I.; WANG, M-H. Involvement of the p38 MAPK and ERK signaling pathway in the anti-melanogenic effect of methyl 3,5-dicaffeoyl quinate in B16F10 mouse melanoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 199, n. 2, p. 106-111, 2012. doi: 10.1016/j.cbi.2012.06.004.

SHI, Y.Z.; HUI, A.M.; TAKAYAMA, T.; LI, X.; CUI, X.; MAKUUCHI, M. Reduced p21^{WAF1/CIP1} protein expression is predominantly related to altered p53 in hepatocellular carcinomas. **British Journal of Cancer**, v.83, n.1, p.50-55, 2000. Doi: 10.1054/bjoc.2000.1310

SILVA, A.E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G.D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.625-633, 2004.

SILVA, M.H.S.; SILVA, J.A.; MAGALHÃES, D.F.; SILVA, M.X.; MENEZES, J.N.C.; MOREIRA, E.C. Demographic and epidemiologic characterization of dogs and cats in Barbacena-MG, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 1002-1006, 2010.

SIMON, J.D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 22, n. 5, p. 563–579, 2009. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00610.x.

SINNAMON, A.J.; SHARON, C.E.; SONG, Y.; NEUWIRTH, M.G.; ELDER, D.E.; XU, X.; CHU, E.Y.; MING, M.E.; FRAKER, D.L.; GIMOTTY, P.A.; KARAKOUSIS, G.C. The prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes for primary melanoma varies by sex. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, n. 2, p. 245-251, 2018. doi: 10.1016/j.jaad.2018.02.066.

SMALLEY, K.; EISEN, T. The involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-induced melanogenic and anti-proliferative effects in B16 murine melanoma cells. **FEBS Letters**, v. 476, n. 3, p. 198-202, 2000.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G.; KITCHELL, B.E.; BERGMAN, P.J.; HO, H.Y.; BERGIN, I.L. KIUPEL, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literatura and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011. doi: 10.1177/0300985810390717.

SNYDER, P.W. Doenças da Imunidade. In: McGAVIN, M.D.; YACHARZ, J.F. **Bases da Patologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Mosby Elsevier, 2009. p.193–298. ISBN: 978-85-352-3239-4.

SOMLO, G.; CHU, P.; FRANKEL, P.; YE, W; GROSHEN, S; DOROSHOW, J.H.; DANENBERG, K.; DANENBERG, P. Molecular profiling including epidermal growth factor receptor and p21 expression in high-risk breast cancer patients as indicators of outcome. **Annals of Oncology**, v.19, n.11, p.1853-1859, 2008. doi: 10.1093/annonc/mdn402

SPANGLER, W.L.; KASS, P.H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 136-149, 2006. doi: 10.1354/vp.43-2-136.

STAMBE, C.; NIKOLIC-PATERSON, D.J.; HILL, P.A.; DOWLING, J.; ATKINS, R.C. p38 Mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, p. 326-336, 2004. doi: 10.1097/01/ASN.000108520.63445.E0.

STEINBERG, S.M.; YAO, Y.; AHMADZADEH, M.; LU, Y-C.; LIEWHER, D.J.; DUDLEY, M.E.; LIU, F.; SCHRUMP, D.S.; ROSENBERG, S.A.; ROBBINS, P.F. Levels of oeripheral CD4+FoxP3+ regulatory T cells are negatively associated with clinical response to

adoptive immunotherapy of human cancer. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5688-5696, 2012. doi: 10.1182/blood-2011-10-386482.

STEWART, T.H.M.; HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, v.115, p. 141-153, 1997.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annual Review Biochemistry**, v.69, p.217-245, 2000. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.217.

SUGIYAMA, D.; NISHIKAWA, H.; MAEDA, Y.; NISHIOKA, M.; TANEMURA, A.; KATAYAMA, I.; EZOE, S.; KANAKURA, Y.; SATO, E.; FULUMORI, Y.; KARBACH, J.; JÄGER, E.; SAKAGUCHI, S. Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. **PNAS**, v. 110, n. 44, p. 17945-17950, 2013. doi: 10.1073/pnas.1316796110.

TADOKORO, R.; TAKAHASHI, Y. Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 45, p. 132–138, 2017. doi: 10.1016/j.gde.2017.05.001.

TAN, W.; ZHANG, W.; STRASNER, A. et al. Tumor-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL-RANK signaling. **Nature**, v.470, p. 548-553, 2011. doi: 10.1038/nature09707.

THOMAS, N.E.; BUSAM, K.J.; DE, L.; KRICKER, A.; ARMSTRONG, B.K.; ANTON-CULVER, H.; GRUBER, S.B.; GALLAGHER, R.P.; ZANETTI, R.; ROSSO, S.; DWYER, T.; VENN, A.; KANETSKY, P.A.; GROBEN, P.A.; HAO, H.; ORIOW, I.; REINER, A.S.; LUO, L.; PAINE, S.; OLLILA, D.W.; WILCOX, H.; BEGG, C.B.; BERWICK, M. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 33, p. 4252-4263, 2013. doi: 10:1200/jco.2013.51.3002.

THUN, M.J.; HENLEY, S.J.; GANSLER, T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. **Novartis Foundation Symposium**, v. 256, p. 6-21, 2004.

TOMINAGA, M.; HORIUCHI, Y.; ICHIKAWA, M.; YAMASHITA, M.; OKANO, K.; JIKUNARU, Y.; NARIAI, Y.; KADOSAWA, T. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 3, p. 438-441, 2010. doi: 10.1177/104063871002200317.

TRIMIS, G.; CHATZISTAMOU, I.; POLITI, K.; KIARIS, H.; PAPA VASSILIOU A.G. Expression of p21^{waf1/cip1} in stromal fibroblasts of primary breast tumors. **Human Molecular Genetics**, v.17, n.22, p. 3596-3600, 2008. doi: 10.1093/hmg/ddn252.

VENTURA, J.J.; TENBAUM, S.; PERDIGUERO, E.; HUTH, M.; GUERRA, C.; BARBACID, M.; PASPARAKIS, M.; NELREDA, A.R. p38 α kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 750-759, 2007. doi: 10.1038/ng2037.

VIEIRA-FILHO, C.H.C.; BARROUIN-MELO, S.M.; DAMASCENO, K.A.; ARAÚJO, M.S.S.; BORGES, N.F.; SILVA, F.L.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Tumor-associated macrophage is correlated with survival and SOCS protein expression. in canine mammary carcinoma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1972-1980, 2018. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5638.

VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxal roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v.6, p.24-37, 2006. doi: 10.1038/nrc1782.

VLCKOVÁ, K.; VACHTENHEIM, J.; RÉDA, J.; HORÁK, P.; ONDRUSOVÁ, L. Inducibly decreased MITF levels do not affect proliferation and phenotype switching but reduce differentiation of melanoma cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2240-2251, 2018. doi: 10.1111/jcmm.13506.

WEISS, E.; FRESE, K. Tumors of the Skin. **Bulletin of the World Health Organization – International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**. 50. ed. 2v. Geneva: World Health Organization, 1974. p. 79-100.

WHITMARSH, A.J.; DAVIS, R.J. A central control for cell growth. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 255–256, 2000. doi: 10.1038/35002220.

WINDER, A.; KOBAYASHI, T.; TSUKAMOTO, K.; URABE, K.; AROCA, P.; KAMEYAMA, K.; HEARING, V.J. The tyrosinase gene family--interactions of melanogenic proteins to regulate melanogenesis. **Cellular and Molecular Biology Research**, v. 40, n. 7-8, p. 613–626, 1994.

WOLF, D.; WOLF, A.M.; RUMPOLD, H.; FIEGL, H.; ZEIMET, A.G.; MULLER-HOLZNER, E.; DEIBL, M.; GASTL, G.; GUNSILIUS, E.; MARTH, C. The expression. of the regulatory T cell-specific Forkhead box transcription fator FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 23, p. 8326-8331, 2005. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1244.

XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R.J.; GREENBERG, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, v. 270, n. 5240, p. 1326–1331, 1995.

ZHANG, Y.; GAO, Y.; ZHAO, L.; HAN, L.; LU, Y.; HOU, P.; SHI, X.; LIU, X.; TIAN, B.; WANG, X.; HUANG, B.; LU, J. Mitogen-activated protein kinase p38 and retinoblastoma protein signalling is required for DNA damage-mediated formation of senescence-associated heterochromatic foci in tumour cells. **FEBS Journal**, v. 280, n. 18, p. 4625-4639, 2013. doi: 10.1111/febs.12435.

ZHAO, J.; YANG, X.; AUH, S.L.; KIM, K.D.; TANGM H.; FU, Y-X. Do adaptative imune cells suppress or active innate immunity? **Trends in Immunology**, v. 30, p. 8-12, 2009. doi: 10.1016/j.it.2008.10.003.

10 ANEXOS

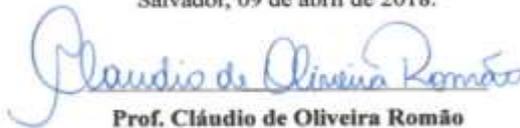
	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
--	--	--

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação morfológica, epidemiológica, histopatológica, imuno-histoquímica e da resposta inflamatória dos melonomas caninos**, registrada com o nº 10/2018, sob a responsabilidade da **Professora Alessandra Estrela da Silva Lima**, e que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia, em reunião ordinária do dia 09/04/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/04/2018 a 01/04/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis lupus familiares</i> /Cães
Nº de animais	50
Peso/Idade	2 a 50kg / 1 a 7 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biopsias de animais atendidos na rotina do Centro Cirúrgico de Pequenos Animais do HOSPMEV da UFBA e amostras advindas de biopsias externas.

Salvador, 09 de abril de 2018.


Prof. Cláudio de Oliveira Romão
 Coordenador CEUA/EMEVZ-UFBA

*Trabalho realizado
 Prof. Alessandra Estrela Lima*