

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**BRUNA MENDES LIMA**

**EXPRESSÃO PROTEICA DAS METALOPROTEINASES 9 E 14 E SUA  
CORRELAÇÃO COM PROLIFERAÇÃO CELULAR E ASPECTOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM MELANOMAS CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS**

**BELO HORIZONTE**

**AGOSTO DE 2019**

**BRUNA MENDES LIMA**

**EXPRESSÃO PROTEICA DAS METALOPROTEINASES 9 E 14 E SUA  
CORRELAÇÃO COM PROLIFERAÇÃO CELULAR E ASPECTOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM MELANOMAS CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

**Área de concentração:** Patologia Investigativa

**Orientador:** Prof. Dr. Enio Ferreira

**Coorientadora:** Profa. Dra. Helen Lima Del Puerto

**BELO HORIZONTE**

**AGOSTO DE 2019**

L732e Lima, Bruna Mendes.  
Expressão proteica das metaloproteinases 9 e 14 e sua correlação com proliferação celular e aspectos histopatológicos em melanomas caninos orais e cutâneos [manuscrito]. / Bruna Mendes Lima. - - Belo Horizonte: 2019.  
54 f.: il.  
Orientador (a): Enio Ferreira.  
Coorientador (a): Helen Lima Del Puerto.  
Área de concentração: Patologia Investigativa.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Melanoma/patologia. 2. Cães. 3. Progressão da Doença. 4. Metástase Neoplásica. 5. Invasividade Neoplásica. 6. Metaloproteases. 7. Imuno-Histoquímica. 8. Dissertação Acadêmica. I. Ferreira, Enio. II. Del Puerto, Helen Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 360



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG  
□

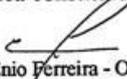
## FOLHA DE APROVAÇÃO

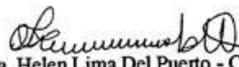
**EXPRESSÃO PROTEICA DAS METALOPROTEINASES 9 E 14 E SUA  
CORRELAÇÃO COM PROLIFERAÇÃO CELULAR E ASPECTOS  
HISTOPATOLÓGICOS EM MELANOMAS CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS**

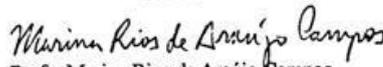
**BRUNA MENDES LIMA**

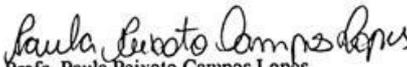
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 22 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Enio Ferreira - Orientador  
UFMG

  
Profa. Helen Lima Del Puerto - Coorientadora  
UFMG

  
Profa. Marina Rios de Araújo Campos  
UFMG

  
Profa. Paula Peixoto Campos Lopes  
UFMG

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui e por ter me dado força, resiliência, sabedoria e coragem para concluir mais essa jornada. Sem Ele nada seria possível!

Agradeço minhas avós Luzia e Bela pelo amor incondicional, apoio, palavras de incentivo e por serem meu ponto de equilíbrio e força. Agradeço meus pais Cristiane e Ricardo por me fazerem nunca desistir dos meus sonhos, e meus irmãos por toda paciência nos momentos de ausência, surto e estresse, além de todo amor que me dão.

Aos meus tios Ranussy e Marcelo, meus anjos da guarda, pelo amor e apoio sempre incondicional. Aos meus tios Charleston, Ranieri, Eloice e Ramon, agradeço pelo incentivo, carinho e ânimo nos momentos de cansaço. À Marina, Helena e Tomaz, pelo companheirismo e por sempre estarem ao meu lado. Ao restante dos familiares por todas as risadas e palavras de carinho, sou sortuda e grata por ter vocês e por serem meu porto seguro. Família, amo vocês até a lua e de volta!

Agradeço aos meus melhores amigos Déborah, Rachel, Jéssica, Ayeska e João Pedro por me ouvirem nos momentos de surtos (sempre constantes!), por me perdoarem nos momentos de ausência e esquecimentos de datas importantes, por me oferecerem palavras de incentivo quando tudo que queria era chorar, pelos abraços, risadas e amizade verdadeira. Amo vocês mesmo sendo trouxas!

Agradeço ao meu orientador Enio Ferreira, por sempre oferecer palavras de incentivo (ou não hahahaha), por sempre estar ao meu lado nos momentos de surtos, por ser bom ouvinte e acima de tudo amigo. Se você não fosse meu orientador certeza que não ia conseguir realizar metade do que realizei nesse mestrado. À minha co-orientadora Helen, por ser essa mãezona e ter sempre palavras de conforto e incentivo.

À minha eterna professora favorita Istéfani, por me trazer para esse laboratório que amo e por me inspirar sempre como profissional. Aos meus amadinhos do LCC: Emerson, Bárbara, Camila e Felipe, por serem esses companheiros de luta diária, gordices e, sobretudo amigos. Sem vocês tudo seria mais difícil. Aos demais amigos do LCC pelas risadas, pelas comilanças, pelas faxinas em momentos aleatórios e companheirismo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Comportamento Celular e Laboratório de Patologia Comparada do Departamento de Patologia Geral - ICB / UFMG, com o apoio do Laboratório de Patologia Comparada – ICB/UFMG e suporte financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

## RESUMO

Melanoma é uma neoplasia altamente metastática, com comportamento agressivo e alta resistência ao tratamento. Aliado a isso, o melanoma canino, por apresentar características clínicas, histopatológicas e moleculares semelhantes às humanas, é considerado um bom modelo para estudos comparativos de desenvolvimento e progressão neoplásica. Durante a progressão neoplásica do melanoma, algumas células adquirem motilidade e capacidade de invadir tecidos adjacentes, levando eventualmente a disseminação metastática. Nesse contexto, a degradação da membrana basal e da matriz extracelular por metaloproteinases (MMPs) é um passo essencial na progressão do melanoma. As MMPs no melanoma encontram-se superexpressas e envolvidas na progressão tumoral, e ainda relacionadas à modulação do microambiente tumoral, estágios avançados do tumor, maior disseminação e pior prognóstico. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão de MMP-9 e MMP-14 e sua relação com características histopatológicas e a proliferação celular em melanomas caninos cutâneos e orais. Foram selecionados 40 casos de melanomas caninos, sendo 20 cutâneos e 20 da cavidade oral para avaliação histopatológica (presença de êmbolo, desmoplasia, atividade juncional, ulceração) e realização da técnica de imunohistoquímica para MMP-9, MMP-14 e Ki67. A expressão de MMP-14 e MMP-9 foi observada em todos os casos, com 75% dos casos cutâneos e 60% dos casos orais apresentando imunomarcagem em mais que 50% das células neoplásicas. Ao analisar a relação entre MMPs e características histológicas, foi observada a associação com a presença de ulceração e êmbolos nos casos cutâneos, e nos casos orais com o índice de proliferação celular. Neste estudo, aparentemente em melanomas caninos cutâneos, a metaloproteinase 14 está associada a características histológicas de agressividade, enquanto em melanomas orais caninos esta associação ocorre com a metaloproteinase 9.

**PALAVRAS-CHAVES:** melanoma, cão, progressão, agressividade, metaloproteinases.

## **ABSTRACT**

Melanoma is a highly metastatic neoplasm, with aggressive behavior and high resistance to treatment. Allied to this, canine melanoma, due to its clinical, histopathological and molecular characteristics similar to that of humans, is considered a good model for comparative studies of neoplastic development and progression. During the neoplastic progression of melanoma, some cells acquire motility and the ability to invade adjacent tissues, eventually leading to metastatic dissemination. In this context, the basal membrane extracellular degradation matrix by metalloproteinases (MMPs) is an essential step in the progression of melanoma. The MMPs recognized in melanoma are overexpressed and involved in tumor progression, and also related to the modulation of the tumor microenvironment, advanced stages of the tumor, greater dissemination and worse prognosis. Thus, this study aimed to evaluate the expression of MMP-9 and MMP-14 and its relationship with histopathologic characteristics and cell proliferation in cutaneous and oral canine melanomas. We selected 40 cases of canine melanomas, 20 cutaneous and 20 from the oral cavity for histopathological evaluation (presence of embolus, desmoplasia, junctional activity, ulceration) and performance of the immunohistochemistry technique for MMP-9, MMP-14 and Ki67. The expression of MMP-14 and MMP-9 was observed in all cases, with 75% of the cutaneous cases and 60% of the oral cases presented immunostaining in more than 50% of the neoplastic cells. When analyzing the relationship between MMPs and histological characteristics, it was observed the association with the presence of ulceration and embolus in cutaneous cases, and in oral cases with the cell proliferation index. In this study, apparently in cutaneous canine melanomas, metalloproteinase 14 is associated with histological characteristics of aggressiveness, while in canine oral melanomas this association occurs with metalloproteinase 9.

**KEYWORDS:** melanoma, dog, progression, aggressiveness, metalloproteinases.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	09
2.1 Melanoma.....	09
2.1.2 Melanoma Humano.....	09
2.1.2 Melanoma Canino.....	13
2.2 Metaloproteinasas e Melanomas.....	17
3 ARTIGO.....	23
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
6 ANEXOS.....	49
Anexo A: Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.....	49
7 APÊNDICE.....	50
7.1 Apêndice: Apresentação de Trabalhos Científicos em Eventos.....	50
Apêndice A. Evento: XVI Encontro Mineiro de Biomedicina- XVI EMBM.....	50
Apêndice B. Evento: X Oncovet.....	51
7.2 Apêndice: Prêmios Recebidos.....	52
Apêndice A. Menção Honrosa - Evento: XVI Encontro Mineiro de Biomedicina.....	52

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia decorrente da transformação maligna dos melanócitos (ALI et al., 2013; FERLAY et al., 2010) da epiderme, trato uveal dos olhos, cóclea e folículos capilares (SCHATTON et al., 2008). Sua incidência tem aumentado nas últimas décadas (RASTRELLI et al., 2014; ARMSTRONG & GOLDSTEIN, 2009; DE VRIES et al., 2006) e apesar de ser menos frequente do que outras neoplasias de pele, apresenta letalidade mais elevada devido a sua característica invasiva, com alta proliferação celular e forte habilidade de disseminação metastática (MORETTI et al., 2008), causando mais que 75% das mortes por câncer de pele em humanos (ARRANGOIZ et al., 2016). No Brasil corresponde a 4% dos casos de câncer de pele e para o ano de 2018 estima-se 6.260 novos casos (INCA, 2018).

Em medicina veterinária, o melanoma é responsável por aproximadamente 7% das neoplasias malignas que acometem a espécie canina representando uma das neoplasias cutâneas mais agressivas e com características clínicas, histopatológicas e moleculares similares à humana (GOLDSCHMIDT & HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005; SIMPSON et al., 2013).

A progressão tumoral em melanomas está diretamente vinculada à expressão de proteínas envolvidas na transição epitélio-mesênquima e expressão de metaloproteinases. Durante a progressão neoplásica do melanoma humano observa-se proliferação desordenada dos melanócitos, além da perda de E-caderina e ganho de expressão de N-caderina, promovendo a invasão à membrana basal e tecidos adjacentes como um nódulo em expansão com potencial metastático (ARRANGOIZ et al., 2016). Durante a etapa de invasão é necessária ação de metaloproteinases (MMPs), enzimas envolvidas na proteólise e remodelamento da matriz extracelular (MEC), de modo a favorecer a migração de células tumorais e degradação da membrana basal (IIDA et al., 2004).

Na medicina veterinária, no entanto, poucos estudos são realizados em melanomas caninos avaliando a expressão de MMPs, e o seu papel ainda não é esclarecido (NAKAICHI et al., 2007; DOCAMPO et al., 2011). Pouco se sabe sobre a sua importância e distribuição em tumores melanocíticos caninos, assim, tornam-se necessários trabalhos que busquem, no aspecto médico-veterinário e comparativo, avaliar o papel das metaloproteinases na progressão dos melanomas caninos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1) Melanoma

O melanoma é uma neoplasia caracterizada pela transformação maligna dos melanócitos (ALI et al., 2013; FERLAY et al., 2010), células produtoras de melanina e que podem ser encontradas na epiderme, cóclea e folículos capilares (SCHATTON et al., 2008). Essas células produtoras de pigmento, embriologicamente derivam de células pluripotentes da crista neural e durante o desenvolvimento fetal migram por toda a epiderme, e outros locais contendo pigmentos extra-cutâneos, como os olhos, meninges, esôfago e membranas mucosas (SCHADENDORF et al., 2015).

Variados marcadores celulares são propostos para a identificação de melanócitos, normais ou neoplásicos, como o Melan-A (*Melanocyte Antigen*) ou MART-1 (*Melanoma Antigen Recognized by T-cells*) como também é conhecido, é uma proteína expressa especificamente por células que produzem melanina (COULIE et al., 1994; KAWAKAMI et al., 1994), e encontra-se não só distribuída nos melanossomos em seus diferentes estágios de maturação, como também em outras organelas e membrana plasmática do melanócito, sendo expressa em até 90% dos melanomas primários e 80% dos metastáticos (DE MAZIERE et al., 2002). O PNL-2 (*Melanoma Marker*) por sua vez, inicialmente foi desenvolvido para a identificação do receptor de somatostatina SST2 humano, entretanto possui alta afinidade por melanócitos (ROCHAIX et al., 2003) e tem alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de melanoma (AUNG et al., 2012; MORRIS et al., 2008).

A propriedade biológica mais proeminente dos melanócitos é a capacidade de produzir melanina (TAJIMA, URA-ISHIKO, HAYASHI, 1996). A ruptura da homeostase da associação íntima entre melanócitos e queratinócitos basais pode desencadear uma proliferação contínua dos melanócitos, o que pode levar ao desenvolvimento do melanoma (HAASS, SMALLEY, HERLYN, 2004).

#### 2.1.1) Melanoma Humano

A incidência mundial de melanoma tem aumentado anualmente a uma taxa mais rápida em comparação com qualquer outro tipo de neoplasia (ALI, YOUSAF, LARKIN, 2013). Em

2012, 232 mil novos casos e 55.000 mortes foram registradas em todo o mundo, ocupando o 15º lugar entre as neoplasias mais comuns (FERLAY et al., 2015).

Sua incidência varia muito entre os países e estes diferentes padrões são atribuídos a variações raciais, fenótipos da pele, bem como diferenças na exposição ao sol (RASTRELLI et al., 2014). Além disso, está sujeita a grandes áreas geográficas e variações étnicas, por causa principalmente da correlação inversa da latitude com grau de pigmentação da pele, sendo as populações residentes próximas à linha do equador as que apresentam maior incidência (SCHERER, KUMAR, 2010).

Ao contrário do observado em outros tumores sólidos, o melanoma afeta principalmente indivíduos de meia-idade, com idade mediana de diagnóstico aos 57 anos. Além disso, a incidência aumenta linearmente após os 25 anos até a idade de 50 anos, e depois diminui particularmente no sexo feminino (RASTRELLI et al., 2014). As mulheres jovens têm frequência 1,7 vezes maior do que em comparação com os homens antes dos 39 anos, assim como é 2,2 vezes maior em homens que em mulheres com mais de 70 anos de idade (LITTLE, EIDE, 2012), e especificamente o risco de desenvolver melanoma ao longo de sua vida é 1,5 vezes maior quando comparado às mulheres (RASTRELLI et al., 2014).

O maior fator de risco para o desenvolvimento de melanoma é a exposição intermitente à radiação ultravioleta (UV), especialmente quando associados a fatores endógenos, tais como fototipos de pele I (pele muito clara, sempre queima, nunca bronzeia) e II (pele clara, sempre queima e algumas vezes bronzeia) (FITZPATRICK, 1988), com presença de características como olhos azuis, verdes, cabelos loiros, ruivos e presença de sardas, além do estado imune e predisposição genética do indivíduo (LEBOIT et al., 2006).

Apesar da exposição solar na infância ser o maior fator de risco para o melanoma, múltiplas queimaduras solares e exposição solar excessiva e inadequada durante a vida adulta aumentam significativamente o risco da doença (LEBOIT et al., 2006). Concomitante a exposição à radiação UV, a suscetibilidade genética, principalmente nos genes CDKN2A, CDK4, MC1R, BRAF, p16/ARF que promovem o acúmulo de mutações genéticas nos melanócitos que levam a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores tumorais e desarranjo dos mecanismos de reparo do DNA (THOMPSON, SCOLYER, KEFFORD, 2005), são relacionados ao desenvolvimento do melanoma. Considera-se ainda como fatores

de risco, embora sem evidências fortes: exposição a câmaras de bronzeamento artificial, histórico pessoal de tumores de pele não-melanoma, nível socioeconômico elevado, cabelos castanhos, estrógeno e progesterona endógenos (MARKOVIC et al., 2007).

A progressão do melanoma inicia-se com uma proliferação controlada de melanócitos normais originando um nevo benigno, o nevo melanocítico comum adquirido. A evolução continua com uma proliferação anormal dos melanócitos em um nevo pré-existente ou em um novo local, resultando em uma lesão pré-maligna com atipia citológica aleatória, denominado como nevos atípicos/displásicos. Essas lesões aparecem como máculas planas, de tamanho superior a cinco milímetros (mm), com bordas irregulares e pigmentação variável. Com o tempo, os melanócitos adquirem a capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme (crescimento radial) e histologicamente mostram atipia contínua (melanoma *in situ*). Algumas células podem invadir a derme papilar e numerosos eventos de adesão celular e interação com a matriz da membrana basal auxiliam na proliferação vertical dessas células na derme como um nódulo em expansão com potencial metastático (crescimento vertical). Com essa progressão, melanócitos malignos podem se disseminar para outras áreas do corpo, primeiramente para os nódulos linfáticos e depois para a pele, tecido mole subcutâneo, pulmões e cérebro (SCHADENDORF et al., 2015).

O melanoma apresenta subtipos histológicos bem definidos, sendo eles o lentigo maligno melanoma, melanoma de espalhamento superficial, melanoma nodular e melanoma lentiginoso acral, que se diferem em comportamentos clínicos e epidemiológicos (SCHADENDORF et al., 2015). Histologicamente os melanomas são identificados por ninhos de melanócitos na derme e/ou epiderme, variando de tamanho, forma e distribuição, com células de citoplasma abundante, núcleos alongados ou ovalados e nucléolos evidentes apresentando padrão celular fusiforme e/ou epitelióide. (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

A presença do pigmento melânico nas células neoplásicas, uma das principais características do melanoma, não é observada em 2 a 20% dos casos, caracterizando o melanoma amelanótico (MCCLAIN et al., 2012). Desse modo torna-se necessário o diagnóstico diferencial a partir da imunohistoquímica para Melan-A e PNL-2 para confirmação do tipo neoplásico (ROLIM et al., 2012; GOLDSCHMIDT, HENDRICK, 2002).

Mais de 90% dos melanomas são encontrados na pele e 4% são descobertos como metástases sem identificação do sítio primário (ARRANGOIZ et al., 2016). Nesse contexto em 1985, Friedman e colaboradores propuseram um método sistemático denominado ABCD, para a avaliação de lesões pigmentadas de modo que os médicos e o público em geral pudessem utilizar para auxiliar na detecção do melanoma cutâneo na etapa inicial. Em 2004 essa sigla foi revisada e expandida para ABCDE. O melanoma frequentemente se apresenta clinicamente com as características ABCDE, especificamente: assimetria (A), irregularidade da borda e da superfície (B), variabilidade da cor (C), diâmetro maior que 6 mm (D) e evolução ou mudança (E) (ABBASI et al., 2004).

O *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), determina o estadiamento dos melanomas segundo o sistema TNM, que é o principal parâmetro clinicopatológico para avaliação prognóstica do melanoma. T determina o tamanho da neoplasia e ainda a presença ou ausência de úlceras. N determina as metástases regionais e a sua carga tumoral e M determina as metástases à distância (PAYETTE et al., 2009; SITUM et al., 2014).

Os dois principais parâmetros prognósticos para avaliação do melanoma são os níveis de Clark e o índice de Breslow. Os níveis de Clark são definidos de acordo com as camadas da pele acometidas pela lesão: nível I: crescimento intraepidérmico; nível II: invasão da derme papilar; nível III: comprometimento da junção derme papilar/derme reticular; nível IV: invasão da derme reticular; nível V: invasão do tecido subcutâneo (CLARK et al., 1969). O índice de Breslow por sua vez, é definido a partir da mensuração, em milímetros, da distância entre a camada granulosa da epiderme ou em caso de úlcera da célula mais superficial até a célula neoplásica mais profunda (BRESLOW, 1970).

Associado a avaliação de extensão dos melanomas por Clark e Breslow, a avaliação histopatológica determinando o subtipo histológico, bem como a presença de ulceração, regressão, índice mitótico, presença e quantidade de linfócitos infiltrantes tumorais e presença de invasão perineural são rotineiras. Avaliação de possíveis metástases em linfonodos sentinelas e outros órgãos também têm importante contribuição para avaliação prognóstica do paciente (PAYETTE et al., 2009).

A caracterização da atividade proliferativa dos tumores pode influenciar no prognóstico dos pacientes (SCULLY, FIELD, TANZAWA, 2000), sendo inclusive uma importante ferramenta

no tratamento (KAUSCH et al., 2003). Dessa maneira a avaliação do índice mitótico associada à estimativa do índice proliferativo por meio de imunohistoquímica para Ki67, são extremamente relevantes na análise prognóstica desse tipo de lesão. (BROWN, GATTER, 2002).

### *2.1.2) Melanoma Canino*

A sequência completa do genoma canino foi lançada em 2005, revelando uma significativa sequência ancestral em comum com os humanos, demonstrando dessa forma, que as sequências de DNA e proteínas caninas são mais semelhantes aos humanos do que as de camundongos (LINDBLAD-TOH et al., 2005). Até recentemente, os humanos podiam ser considerados modelos pré-clínico para cães, sendo a maioria dos medicamentos usados na medicina veterinária derivados de drogas inicialmente projetadas e testadas para eficácia em humanos (DER WEYDEN et al., 2016).

Cães, espontaneamente, apresentam tumores com as mesmas características anatômicas e fisiológicas das neoplasias humanas, desenvolvem-se durante longos períodos de tempo na presença de um sistema imunológico intacto que interage intimamente com as células neoplásicas, moldando o desenvolvimento e a progressão como ocorre em humanos. Além disso, animais domésticos e os proprietários compartilham o mesmo ambiente e estão expostos aos mesmos carcinógenos, compondo uma condição fundamental que impulsiona o desenvolvimento do tumor (BARUTELLO et al., 2018).

Os melanomas caninos e humanos apresentam diversas semelhanças, como o aspecto histológico, alterações genéticas, alvos moleculares, comportamento biológico e resposta as terapias convencionais (PAOLONI, KHANNA, 2008). Neste cenário o cão é proposto como modelo comparativo oncológico pré-clínico (SIMPSON et al., 2013).

O melanoma canino representa 7% de todas as neoplasias que acometem a espécie (GOLDSCHMIDT, HENDRICK, 2002; GROSS et al., 2005), e atinge diferentes sítios anatômicos tais como a cavidade oral, pele, olhos e dígitos (CURTIN et al., 2005; OMHOLT et al., 2011). O melanoma da cavidade oral é considerado mais comum, agressivo e com pior prognóstico do que os ocorrentes na pele (RAMOS-VARA et al., 2000). Apresenta invasão local nos ossos em 57% das lesões, metástases para os linfonodos regionais em 30,3% a 74%

dos casos, e para os pulmões e outros órgãos distantes em 14% a 92% dos cães afetados (WILLIAMS, PACKER, 2003).

O melanoma canino não apresenta predisposição relacionada ao sexo, e tende a acometer raças que possuem a pele intensamente pigmentada, além de uma maior incidência em animais adultos a idosos e sem raça definida (CAMARGO, CONCEIÇÃO, COSTA, 2008). As raças de cães mais comumente afetadas são Airedale Terrier, Boston Terrier, Boxer, Chihuahua, Chow Chow, Cocker Spaniel, Doberman Pinscher, English Springer Spaniel, Golden Retriever, Irish Setter, Scottish Terrier, Poodles, Beauce Shepherd, Rottweilers, e Labrador Retrievers, porém a verdadeira incidência por raça ainda não é bem estabelecida (BERGMAN, 2013). Na realidade brasileira, o diagnóstico dessa neoplasia geralmente ocorre em animais adultos a idosos, machos, sem raça definida e de pelagem escura (TEIXEIRA et al., 2010).

Não existe consenso sobre a etiologia do melanoma em cães, entretanto diversos fatores parecem estar envolvidos, incluindo consanguinidade, trauma, exposição química, hormônios e suscetibilidade genética (MODIANO, RITT, WOJCIESYN, 1999). A luz solar pode estar envolvida na carcinogênese em áreas da pele expostas ao sol, tais como o rosto e pina, no entanto, é improvável que esteja envolvida em melanomas mucosos, como os encontrados na cavidade oral. Outros fatores, como a presença de células pigmentadas, microbiota bucal e a inflamação podem estar associadas à sua etiologia (DZUTSEV et al., 2015).

Diversas anormalidades moleculares e em vias de sinalização descritas em melanoma humano podem ser encontradas no melanoma canino, incluindo formas fosforiladas de AKT e ERK1/2, alterações do receptor tirosinase KIT e PTEN (SIMPSON et al., 2013). Essas alterações demonstram similaridades imunohistoquímicas com subtipos de melanoma humano, particularmente aqueles com localizações mucosas, digitais e ungueais que geralmente apresentam alto crescimento e comportamento agressivo (KHANNA et al., 2006).

O estadiamento dos melanomas caninos difere de acordo com a localização da lesão, sendo os parâmetros para o melanoma oral melhor estabelecido e padronizado na literatura pelas recomendações da OMS, a partir do sistema TNM. Segundo o tamanho (T) a lesão deve ser classificada em T1: se 4 centímetros (cm) de diâmetro, neste parâmetro avalia-se ainda a ausência (a) ou presença (b) de invasão óssea. Quanto ao estado dos linfonodos regionais (N)

a lesão é classificada em N0: sem evidência de metástases; N1: linfonodos ipsilaterais acometidos por metástases; N2: linfonodos contralaterais acometidos por metástases; N3: linfonodos englobados pela massa tumoral primária, e quanto a metástases distantes a lesão é classificada em M0 se ausentes e M1 se presentes. A partir desta classificação os melanomas são classificados em 4 estádios: I, quando menores que 2cm, sem evidência de metástases (T1N0M0); II, quando entre 2 a 4cm sem evidência de metástases (T2N0M0); III, quando maior que 4cm sem evidência de metástases (T3N0M0) ou quando apresentarem metástases no linfonodo ipsilateral (T1,2,3N1M0) e IV, quando apresentarem metástases no linfonodo contralateral ou quando englobados pela massa primária (T1,2,3N2,3M0) ou ainda quando apresentaram metástases distantes (T1,2,3N1,2,3M1), sendo que quanto maior o estadio menor é a sobrevida observada, porém este sistema ainda não é amplamente utilizado e em alguns centros os estádios são realizados com algumas adaptações (BERGMAN, 2007; NISHIYA et al., 2016). Os tempos médios de sobrevida de cães tratados com cirurgia são aproximadamente de 17 a 18 meses, 5 a 6 meses e 3 meses para a doença nos estágios I, II e III, respectivamente (MACEWEN et al., 1986).

O diagnóstico do melanoma canino baseia-se principalmente nos achados clínicos e histopatológicos (ROLIM et al., 2012). Na histopatologia se observa o padrão celular dos melanócitos e outras características como presença de ulceração, desmoplasia, atividade juncional e avaliação do índice mitótico (BERGIN et al., 2011; SCHULTHEISS, 2006).

Os melanomas caninos, semelhante aos humanos, apresentam-se como uma proliferação de melanócitos anaplásicos, pigmentados ou não, formando ninhos, com perda da relação núcleo/citoplasma, nucléolos evidentes e, por vezes, acometimento das camadas basais da epiderme (GOLDSCHMIDT et al., 1998). Em cães, o melanoma pode ser subdividido em 3 classificações com base no padrão celular: a) epitelióide: quando as células neoplásicas reproduzem o fenótipo das células epiteliais; b) fusiforme: quando as células neoplásicas têm morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos; e c) misto: quando os dois padrões celulares são observados (GOLDSCHMIDT et al., 1998; HEAD, ELSE, DUBIELZIG, 2002).

Aparentemente, tipos histológicos epitelióides apresentam maior alteração na cromatina, o que está relacionado a uma maior agressividade em neoplasias pigmentadas (CHI et al., 1993), já os de células fusiformes tendem a apresentar tecido desmoplásico entre seus componentes histológicos (WEISSINGER et al., 2014).

O diagnóstico histopatológico do melanoma pode ser dificultado se o tumor não contém melanina. Melanomas amelanóticos representam cerca de um terço de todos os casos de melanoma em cães e podem se assemelhar histologicamente com carcinomas, sarcomas, linfomas e tumores osteogênicos (NISHIYA et al., 2016). Por esta razão a histopatologia deve ser associada à imunohistoquímica para Melan-A e PNL-2 (SMEDLEY et al., 2011). Os tumores pigmentados tendem a apresentar um comportamento diferente dos tumores amelanóticos. Em humanos, os grânulos de melanina tumorais exercem influência sobre os melanócitos neoplásicos, facilitando o desenvolvimento de metástases. Porém, na espécie canina, os tumores orais amelanóticos apresentam maiores índices proliferativos quando comparados aos pigmentados (TEIXEIRA et al., 2014).

Um marcador amplamente utilizado para avaliar proliferação celular e agressividade tumoral em melanoma é a proteína Ki67, considerado um marcador extremamente sensível e útil no monitoramento e tratamento da doença, bem como para avaliar o risco do desenvolvimento de metástases (BROWN, GATTER, 2002). Quando associado à mensuração do índice mitótico, o Ki67 representa um dos principais indicadores prognósticos para os melanomas caninos (BERGIN et al., 2011; CANGUL, 2001).

Outros parâmetros avaliados na histopatologia englobam a desmoplasia, que trata-se da deposição de tecido conjuntivo fibroso em meio ao estroma tumoral, considerada na medicina humana como um subtipo de melanoma e não somente um achado histológico. Ainda é muito controverso se a presença de desmoplasia confere um pior ou melhor prognóstico (MACEDO PASCHOAL et al., 2012). A presença de atividade juncional descrita como migração de melanócitos da camada basal da epiderme para a porção mais externa dessa mesma camada, também ocorre em cães (SMEDLEY et al., 2011). Em humanos, representa um subtipo histológico denominado chamado de melanoma lentiginoso (KING, 2011).

A presença de ulceração, definida como ausência de epiderme intacta sobre uma porção significativa do tumor primário (BALCH, 1980), também é discutida por alguns autores como um possível marcador prognóstico, entretanto, para as lesões orais não foi observada associação entre a presença de úlceras e o tempo de sobrevida (HAHN et al., 1994; SCHULTHEISS, 2006). Contudo, para as lesões cutâneas, essa informação ainda é controversa (LAPRIE et al., 2001).

## 2. 2) Metaloproteinases e Melanomas

Metaloproteinases de matriz (MMPs), ou matrixinas como também são conhecidas, são enzimas pertencentes à família de endopeptidases, zinco-dependentes, secretadas como pró-enzimas e por variedade de células, tais como mesenquimais, fibroblastos, queratinócitos, polimorfonucleares, macrófagos e tumorais, que têm como função mais estudada a degradação de componentes da matriz extracelular (MEC), especificamente proteoglicanos, glicoproteínas e colágenos da membrana basal (YOKOTA et al., 2002).

Essas proteínas estão envolvidas em processos fisiológicos como fertilização, implantação embrionária, embriogênese, morfogênese e diferenciação e em processos patológicos tais como inflamação, cicatrização, artrite, fibrose hepática, enfisema, aterosclerose e neoplasias (EGEBLAD, WERB, 2002). Sua ativação é dependente de ligação com um íon de metal como  $Zn^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  em seus sítios de ativação. O íon usualmente serve para coordenar dois a quatro lados das cadeias e é indispensável para atividade da enzima. O íon, por si só, é coordenado por uma molécula de água, a qual é também crucial para a atividade catalítica (NAGASI, WOESSNER, 1999; FREDERICK, NAGASI, 2002; VISSE, NAGASI, 2003). O funcionamento adequado das MMPs envolve a ligação de  $Ca^{2+}$  para manter a conformação da molécula, assim como de  $Zn^{2+}$  ligado no sítio ativo da enzima (NAGASI, WOESSNER, 1999).

Existem mais de 30 metalopeptidases e de acordo com sua estrutura, especificidade do substrato e localização celular, podem ser divididas em cinco grupos: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-7, MMP-10 e MMP-11), tipo membranas (MT-MMP-1 a MT-MMP-6) e matrilisinas (MMP-12, MMP-18, MMP-19 até MMP-26) (ARAÚJO et al., 2011). As MT-MMPs são ligadas covalentemente à membrana celular, enquanto as MMPs secretadas (collagenases, gelatinases, estromelinas e matrilisinas), localizam-se na superfície celular através da ligação com integrinas ou interação com proteoglicanas e colágeno tipo IV (NAGASI, WOESSNER, 1999; VISSE, NAGASI, 2003).

O processo de ativação e inibição das MMPs é extremamente complexo e dinâmico, sendo modulado através da expressão gênica, ativação de pró-enzimas latentes e interação com inibidores (SELTZER, EISEN, 2003). Por sua vez, a transcrição dos seus genes são reativos a

uma grande variedade de oncogenes, fatores de crescimento, citocinas e hormônios (VISSE, NAGASI, 2003).

As MMPs são sintetizadas como proteínas inativas (pró-enzimas latentes), incapazes de realizar proteólise e que podem ser ativadas pela tripsina, plasmina, furina ou mesmo outras metaloproteinases como a estromelina e as tipo membrana. Também podem ser ativadas *in vitro*, por agentes químicos como mercuriais, glutatona oxidada, dodecil sulfato de sódio, agentes caotrópicos, oxigênio reativo, além de baixo pH e aquecimento (VISSE, NAGASI, 2003). Tais agentes, muito provavelmente, atuam removendo o domínio pró-peptídeo e expondo o  $Zn^{2+}$  (VAN-WART, BIRKEDAL-HANSEN, 1990), associado a esse processo, a ativação enzimática da pró-enzima ocorre pelo deslocamento do resíduo de cisteína (chave-cisteína) presente no pró-domínio, mediante clivagem proteolítica ou quebra química (NAGASE, WOESSNER, 1999).

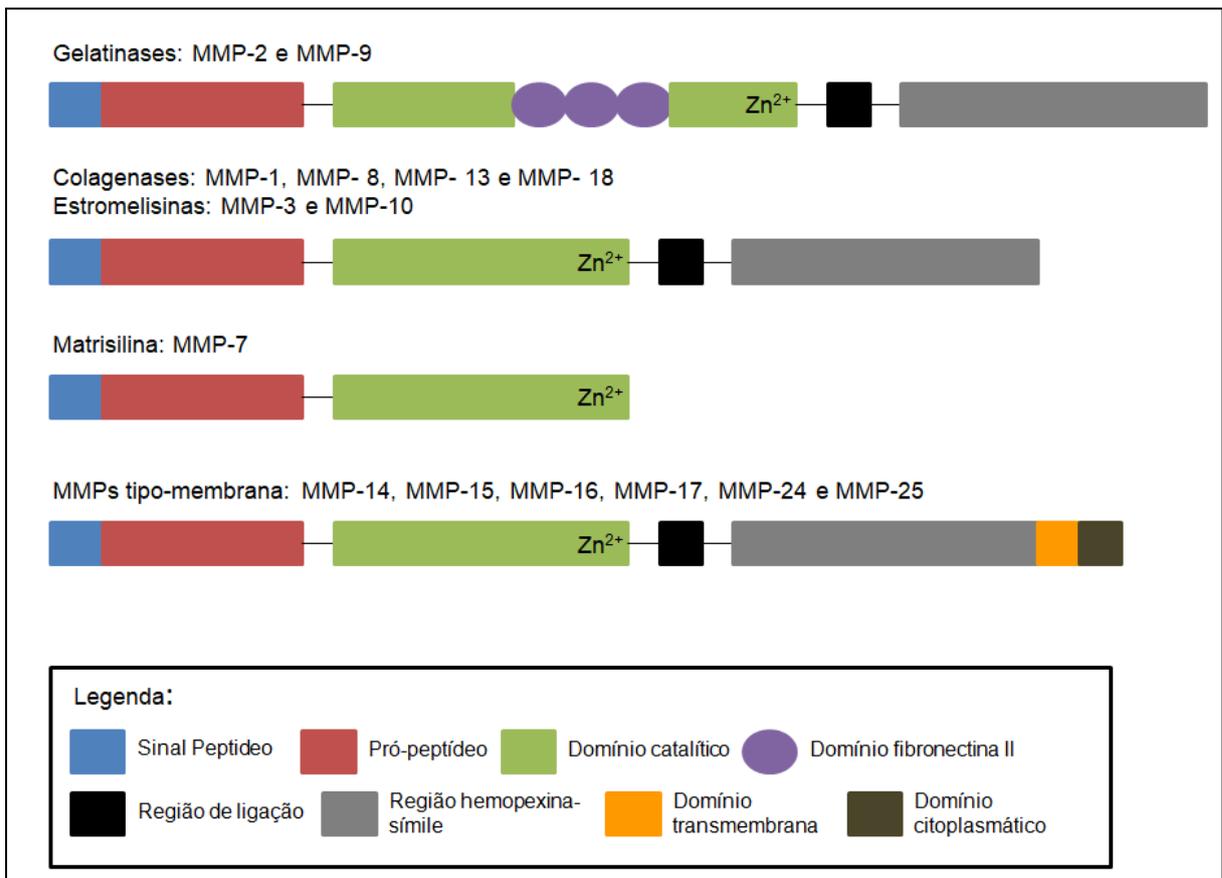
Existem uma série de inibidores das MMPs que rapidamente bloqueiam suas ações, entre eles estão os membros da família das  $\alpha_2$ -macroglobulinas, as trombospondinas, e principalmente os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs) (WEI et al., 2003). Esses inibidores são glicoproteínas, constituída por quatro membros, TIMP-1, -2, -3 e -4, que inibem de forma seletiva, reversível, não covalente e com estequiometria molecular na razão 1:1 (UENO et al., 1996).

As metaloproteinases apresentam várias características em comum. Todas contêm zinco na região ativada unida à sequência conservada HEXXHXXGXXHXXXXXXXXXM, onde H é uma histidina, E corresponde ao ácido glutâmico, X representa um aminoácido variável e M é uma metionina (SELTZER, EISEN, 2003). Estruturalmente, são constituídas por um pró-domínio, com aproximadamente 80 aminoácidos, responsável por manter a latência enzimática das pró-MMPs, um domínio catalítico, composto de aproximadamente 170 aminoácidos, e um domínio C-terminal semelhante à hemopexina com cerca de 210 aminoácidos. Além desses, as metaloproteinases tipo-membrana possuem um domínio transmembrana (NAGASE, WOESSNER, 1999; POLETTE et al., 2004).

A figura 1 apresenta os domínios estruturais das principais metaloproteinases. Estruturalmente, as duas gelatinases MMP-2 e MMP-9 possuem um adicional domínio de fibronectina tipo II, que é inserida entre o domínio catalítico e o domínio do sitio ativo. Já as

seis MMPs de tipo-membrana (MMP-14 a 17 e MMP-24 e 25) possuem um domínio transmembrana adjacente ao domínio C-terminal e um domínio intracelular (HOFMANN et al., 2000).

**Figura 1.** Representação esquemática dos domínios estruturais das metaloproteinasas



**Fonte:** Adaptado de HOFMANN et al., 2000.

Todas as MMPs são sintetizadas dentro da célula. Então, seu RNA mensageiro (mRNA) especifica uma sequência de sinal hidrofóbica (sinal peptídeo), tipicamente contendo 18 a 30 aminoácidos. Essa região é cortada durante a passagem da pró-enzima ao meio extra-celular. O domínio pró-peptídeo estende-se do N-terminal criado após a remoção do sinal peptídeo até o começo do domínio catalítico em um comprimento de 80 aminoácidos. O resíduo de cisteína da sequência conservada PRCGVPD está posicionado de forma diretamente oposta ao  $Zn^{2+}$  no centro ativo. A remoção desse resíduo de cisteína ativa a pró-enzima. O domínio fibronectina II apresenta 58 resíduos em três repetições e é responsável pela especificidade da ação colagenolítica. O domínio catalítico por sua vez, apresenta cerca de

170 aminoácidos com o centro ativo catalítico com 50-54 resíduos C-terminais. A região de ligação liga a região hemopexina-símile com o domínio catalítico, e a região hemopexina-símile possui aproximadamente de 210 resíduos e determina substratos e inibidores de cada MMP (FREDERICK, NAGASI, 2002; VISSE, NAGASI, 2003; SELTZER, EISEN, 2003).

As metaloproteinases 9 fazem parte do grupo das gelatinases que possuem como substrato principalmente o colágeno desnaturado (gelatina) e colágeno tipo I, IV, V, VII, X, XI, XIV, elastina, laminina, entactina, fibronectina, vitronectina, osteonectina, plasminogênio, pró-MMP-2 e 9 (De GROEF et al., 2014). Por sua vez, as metaloproteinases 14 são ligadas à membrana e são responsáveis pela degradação de componentes como colágeno tipo I, II, III, fibronectina e gelatina, laminina, vitronectina, entactina, proteoglicanos, agreguina e pró-MMP-2 e 13 (NABESHIMA et al., 2002).

Durante a progressão neoplásica, algumas células tumorais adquirem motilidade e capacidade de invadir o tecido levando eventualmente a disseminação metastática. Tal processo de invasão requer interações célula-matriz e atividades proteolíticas específicas. A degradação da MEC durante a invasão tumoral e angiogênese promove a liberação de moléculas ativas armazenadas na matriz e/ou gera fragmentos ativos de componentes da MEC que promovem crescimento tumoral, invasão e angiogênese (STERNLICHT, WERB, 2001; ENGBRING, KLEINMAN, 2003).

A invasão estromal de células tumorais, bem como a formação de metástases, é um processo complexo que envolve o destacamento de células neoplásicas do tumor primário, rompimento da membrana basal, invasão do tecido estromal peritumoral, intravasamento para a circulação linfática ou sanguínea e, finalmente, extravasamento para órgãos distantes para formar um segundo tumor. A degradação e remodelamento da MEC e membrana basal por enzimas proteolíticas são essenciais nesse processo (HOFMANN et al., 2000).

Na homeostase tecidual normal, a interação das proteases e seus inibidores naturais mantém um equilíbrio proteolítico. Na progressão neoplásica, o equilíbrio é perturbado pela superexpressão de proteases e diminuição da expressão de seus inibidores, desse modo o compartimento não celular é alterado e ativa efetores que levam ao estabelecimento de um meio permissivo para progressão tumoral, invasão e disseminação (NOE, JOST, MAQUOI, 2008).

As MMPs estão implicadas no câncer há mais de 40 anos, sendo superexpressas em uma ampla gama de tumores malignos em resposta à transformação celular oncogênica, citocinas e vários fatores de crescimento e angiogênicos (ENGBRING, KLEINMAN, 2003). Sua relação na fisiopatologia de inúmeras neoplasias tem sido descrita na literatura de modo correlacionada com fator prognóstico (VAISANEN et al., 1998), diagnóstico (WILSON et al., 2006) e alvo terapêutico (OVERALL, KLEIFELD, 2006). Além disso, tem-se estudado MMP-9 e MMP-14 em câncer de mama (MYLONA et al., 2007); câncer de pâncreas (SCHNEIDERHAN et al., 2007); carcinoma gástrico (ZHENG et al., 2006); câncer de pulmão (BUGDAYCI et al., 2006); neuroblastoma (SAKAKIBARA et al., 1999) e em melanomas (HOFMANN et al., 2000).

A MMP-9 e MMP-14 podem agir de várias formas no processo de disseminação de tumores, por mediar a degradação da MEC e membrana basal, podem atuar em fases precoces do processo de tumorigênese, contribuindo para a formação de um microambiente que promova o crescimento tumoral (MYLONA et al., 2007). Participam da progressão tumoral por meio da clivagem de membranas basais, receptores do fator de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, ligantes apoptóticos e fatores angiogênicos, contribuindo para a proliferação tumoral, invasão, intravasamento em circulação, extravasamento, migração para sítios metastáticos e angiogênese (CHAUDHARY et al., 2010). Também participam em estágios mais tardios do desenvolvimento tumoral, promovendo o crescimento sustentado tanto de tumores primários quanto metastáticos pela ativação de fatores de crescimento, inativação de proteínas de ligação a fatores de crescimento ou pela liberação de moléculas mitogênicas residentes na MEC (NABESHIMA et al., 2002). Ainda apresentam papel na neoangiogênese tumoral, bem como no controle da apoptose por clivar receptores e ligantes que participam na transdução de sinais pró-apoptóticos. (MYLONA et al., 2007).

Além disso, evidências demonstram que a superexpressão de várias MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-14) estão associadas à transição epitélio-mesênquima, processo biológico fundamental em que as células epiteliais perdem sua polaridade, adesão célula-célula com conseqüente ganho de expressão de N-caderina e perda de expressão de E-caderina, adotando um fenótipo mesenquimal apropriada para migração (GILLES et al., 2004).

Em melanoma humano, metaloproteinases têm sido foco de atenção nos últimos anos, na localização cutânea, trato uveal dos olhos e cavidade oral. Dentre todas as MMPs, as que parecem estar mais relacionadas com a fisiopatologia do melanoma humano e canino incluem: MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-13 e MMP-14, bem como seus inibidores tissulares TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (PIRES et al., 2013).

Embora o papel das MMPs no melanoma permaneça controverso (HOFMANN et al., 2005; REDONDO et al., 2005), a MMP-9 e MMP-14 são frequentemente superexpressas em tumores melanocíticos, em estágios avançados do tumor, e estão associados aos casos mais invasivos, agressivos e pior prognóstico. Os processos de ativação específicos e sua localização durante a migração das células neoplásicas ainda são pouco compreendidas (HOFMANN et al., 2005); no entanto, MMP-9 foram detectadas em um elevado número de organelas vesiculares, o que pode ser uma forma de realizar uma proteólise específica e direcional durante a migração celular, invasão e angiogênese (MANNELLO, MEDDA, 2012).

Pesquisas em melanomas caninos demonstraram o aumento na expressão de MMP-9 em comparação com tumores melanocíticos benignos. Sua expressão é abundante e apresenta distribuição homogênea em células tumorais e estromais. Além disso, expressa de forma variada nos grupos de fase de crescimento radial invasivo, mas não na fase de crescimento vertical (PIRES et al., 2013). A MMP-14 por sua vez, está envolvida em diferentes estágios de desenvolvimento tumoral, crescimento e angiogênese, invasão, metástase e crescimento em sítios secundários, e por ser ativador da MMP-2 promove melhorias e facilita os processos de migração, invasão e crescimento, mecanismos que são independentes da atividade catalítica das enzimas. Os resultados sugerem ainda que a MMP-14 contribui com a progressão neoplásica independentemente da sua capacidade de ativar a MMP-2 (SOUNNI, NOEL, 2005).

Finalmente, a MMP-9 e MMP-14 podem clivar receptores de adesão de superfície celular, como CD44 e integrinas, além de proteoglicanos, contribuindo nos processos de invasão, metástase e angiogênese (KAJITA et al., 2005). E ainda, através da interação com moléculas de adesão ou proteínas específicas da MEC, como laminina-5, a MMP-14 pode modular fortemente a adesão celular e organização citoesquelética levando à mobilidade celular (SOUNNI, NOEL, 2005), favorecendo ainda mais o processo de invasão.

### **3. ARTIGO**

O artigo encontra-se nas normas do periódico a que será submetido.

**Artigo: METALOPROTEINASES 9 E 14 APRESENTAM ASSOCIAÇÕES  
DISTINTAS COM CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS EM MELANOMAS  
CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS**

Este trabalho será submetido ao *Veterinary Research Communications*, que possui Qualis CAPES B3 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 0.981.

## METALOPROTEINASES 9 E 14 APRESENTAM ASSOCIAÇÕES DISTINTAS COM CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS EM MELANOMAS CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS

Bruna M. Lima<sup>1</sup>, Emerson S. Veloso<sup>1</sup>, Bárbara A. Carvalho<sup>1</sup>, Geovanni D. Cassali<sup>2</sup>,  
Helen L. Del Puerto<sup>1</sup>, Enio Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório do Comportamento Celular, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brasil. Autor correspondente: [enioferreira@ufmg.br](mailto:enioferreira@ufmg.br)

<sup>2</sup> Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brasil.

**RESUMO:** Melanoma é uma neoplasia altamente metastática, com comportamento agressivo e alta resistência ao tratamento tanto em medicina humana quanto veterinária. Aliado a isso, o melanoma canino, por apresentar características histopatológicas e moleculares semelhantes às humanas, é considerado um bom modelo para estudo comparativo de progressão neoplásica. Nos cães atinge localidades como cavidade oral, pele e dígitos, além disso, muitos estudos confirmam que os melanomas orais são mais agressivos e têm pior prognóstico quando comparados aos cutâneos. A degradação da membrana basal e da matriz extracelular por metaloproteinases (MMPs) é um passo essencial na progressão do melanoma, associado a esse processo, concentrações aumentadas de MMPs estão associadas com migração, invasão e metástase. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão da MMP-9 e MMP-14 e sua relação com características histopatológicas de progressão e marcador prognóstico em melanomas caninos cutâneos e orais. Foram selecionados 40 casos de melanomas caninos, sendo 20 cutâneos e 20 da cavidade oral do acervo do Laboratório do Comportamento Celular do ICB/UFMG, para avaliação histopatológica (presença de êmbolo, desmoplasia, atividade juncional, ulceração) e realização da técnica de imunohistoquímica para MMP-9, MMP-14 e KI67. A expressão de MMP-14 e MMP-9 foi observada em todos os casos, com 75% dos casos cutâneos e 60% dos casos orais apresentando imunomarcagem em mais que 50% das células neoplásicas. Ao analisar a relação entre MMPs e características histológicas, foi observada a associação com a presença de ulceração e êmbolos nos casos cutâneos, e nos

casos orais com o índice de proliferação celular. Neste estudo, aparentemente em melanomas caninos cutâneos, a metaloproteinase 14 está associada a características histológicas de agressividade, enquanto em melanomas orais caninos esta associação ocorre com a metaloproteinase 9.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** melanoma, cão, progressão, agressividade.

## INTRODUÇÃO

O melanoma constitui a neoplasia cutânea mais agressiva, com alta capacidade invasiva, elevado índice metastático e baixa resposta terapêutica, causando mais que 75% das mortes por câncer de pele (Arrangoiz 2016). No Brasil corresponde a 4% dos casos de câncer de pele e estima-se 6.260 novos casos para o ano de 2018 (Instituto Nacional do Câncer 2018).

Em cães, o melanoma apresenta grande relevância clínica, representando aproximadamente 7% das neoplasias malignas, e que pode surgir, semelhante a humanos, na cavidade oral, pele, olhos e dígitos (Gross et al. 2006, Omholt et al. 2011). Além disso, pode apresentar características moleculares, histopatológicas e clínicas similares às observadas em humanos e tem sido proposto como modelo comparativo oncológico pré-clínico (Simpson et al. 2013).

Estudos demonstram que o melanoma canino oral é mais comum, agressivo e com ocorrência de metástase em até 80% dos casos (Bergman 2013). Além disso, apresentam pior prognóstico do que melanomas cutâneos, apresentando tempo de sobrevida em torno de 36 meses, dependendo das características intrínsecas do tumor e do estágio da doença (Boston et al. 2014, Liptak & Withrow 2013).

As características de agressividade observadas em melanomas são associadas a inúmeros fatores, dentre eles destaca-se a capacidade de invadir o tecido adjacente, promovendo a disseminação metastática (Engbring, & Kleinman 2003). Tal processo de invasão requer degradação da matriz extracelular (MEC) e membrana basal por enzimas proteolíticas, conhecidas como metaloproteinases, além de interações célula-matriz específicas, favorecendo o crescimento tumoral, invasão e angiogênese (Sternlicht & Werb 2001).

As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases, zinco-dependentes, secretadas por uma variedade de células, como as tumorais, mesenquimais e macrófagos, sendo capazes de degradar a maioria dos componentes da matriz extracelular (Araujo et al, 2011, Visse & Nagase 2006). De acordo com sua estrutura, especificidade do substrato e localização celular, são divididas em cinco grupos: colagenases, gelatinases, estromelisininas, tipo membranas e matrilisininas (Araujo et al., 2011). As MMPs 9 fazem parte do grupo das gelatinases que possuem como substrato principalmente o colágeno desnaturado (gelatina) e colágeno tipo IV (De Groef et al. 2014). MMPs 14 são ligadas à membrana e responsáveis pela degradação de colágeno tipo I, II, III, fibronectina e gelatina, além de apresentarem papel importante na ativação das outras metaloproteinases (Nabeshima et al. 2002).

O aumento na expressão de MMPs, bem como sua relação com invasão e metástase são demonstradas desde a década de 1990 em diversos tipos de neoplasias humanas, como de mama (Basset et al. 1990), cólon (McDonell et al. 1991), pâncreas (Bramhall et al. 1997) e no melanoma (Hofmann et al. 2000). No melanoma, assim como em outras neoplasias, as metaloproteinases encontram-se superexpressas e envolvidas na progressão tumoral, e ainda parecem estar relacionadas à modulação do microambiente tumoral, estágios avançados do tumor, maior disseminação e pior prognóstico (Docampo et al. 2011, Pires et al. 2013).

Frente a alta agressividade e baixa resposta terapêutica do melanoma em medicina veterinária juntamente com a escassez de estudos acerca da complexidade da atividade das metaloproteinases em modelos espontâneos dessa doença, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a expressão da metaloproteinase 9 e metaloproteinase 14 e sua relação com características histopatológicas de progressão e marcador prognóstico em melanomas caninos cutâneos e orais.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Aspectos éticos*

Este trabalho 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 Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 008/2016).

### *Espécimes*

Foram analisados 40 casos de melanoma obtidos de cães de diversas raças submetidos a exérese cirúrgica no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG) cuja amostras foram enviadas ao Laboratório do Comportamento Celular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG para diagnóstico histopatológico. Foram utilizadas amostras recebidas entre os anos de 2005 e 2018.

### *Avaliação Histopatológica*

Foram utilizadas amostras incluídas em parafina, que previamente passaram por fixação em formol neutro e tamponado a 10%. Foram obtidas secções histológicas de 4µm, coradas então pela técnica da hematoxilina-eosina para análise em microscopia óptica e classificação histológica de acordo com Goldschmidt e colaboradores (1998). Os melanomas foram classificados qualitativamente quanto a sua pigmentação em escore 0 a 3, sendo 0 a ausência de células neoplásicas pigmentadas; 1: 1-25% células neoplásicas pigmentadas; 2: 26-50% de células neoplásicas pigmentadas; 3: >51% de células neoplásicas pigmentadas. Os casos que apresentaram pigmentação 3 não foram incluídos neste estudo visto a dificuldade de visualização da marcação imunohistoquímica citoplasmática. Dos casos analisados, aqueles com escore 0 foram considerados amelanóticos enquanto os que apresentaram escore 1 e 2 foram considerados melanóticos. Avaliou-se ainda a presença de êmbolos, ulceração, desmoplasia e atividade juncional (lentiginosa ou pagetoide).

### *Imunohistoquímica*

O procedimento imunohistoquímico foi realizado pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Novolink Polymer Detection Sistem*; Leica 43 Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica ocorreu em 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). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 15 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 16 horas (anti-Metaloproteinase9, anti-Metaloproteinase14; anti-Ki67; anti-MelanA e anti-MelanomaAntigen) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (*Liquid DAB + Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. Na Tabela 1 estão listados os anticorpos com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário utilizados na técnica de imunohistoquímica. Para controle negativo foi omitida a etapa de incubação do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

#### *Interpretação da imunohistoquímica*

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em aumento de 40x (Olympus – BX41). Os anticorpos anti-Melan-A e anti-Melanoma Antigen foram utilizados para comprovar o diagnóstico de melanoma nas amostras estudadas. Realizou-se a imunohistoquímica para Melan-A em todos os casos e para Melanoma-Antigen em todos os casos amelanóticos e para aqueles melanóticos que não apresentaram marcação para Melan-A. Foram considerados positivos os casos que apresentaram marcação citoplasmática em mais que 10% das células neoplásicas (Smedley et al. 2011).

O anticorpo anti-Ki-67 foi utilizado para determinar o índice proliferativo das lesões, a partir da obtenção do percentual de células neoplásicas com marcação nuclear em 500 células. Foram considerados de alto índice proliferativo os casos orais com índice >19.5% e os cutâneos com índice >15% (Smedley et al. 2011).

A expressão da metaloproteinase 9 e metaloproteinase 14 foi avaliada a partir da marcação citoplasmática de células neoplásicas, classificada segundo o percentual de células marcadas, sendo: 0 (<5%), 1 (5-20%), 2 (21-49%), 3 (>50%); e segundo a intensidade de marcação: 0 (ausência de marcação), 1 (fraco), 2 (moderado) e 3 (forte) (Adaptado de Pires et al. 2013).

### *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software *GraphPad Prism* v. 5.0 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA). Para relacionar as variáveis, foi utilizado o Teste Qui-quadrado ou método Exato de Fisher. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. Para os resultados quantitativos realizou-se ainda a comparação de médias pelo teste t ou Mann-Whitney a depender da normalidade dos dados. Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### *Características histológicas*

Dos 40 tumores caninos analisados, 20 eram cutâneos e 20 eram da cavidade oral. Dos casos analisados observou-se maior frequência do padrão celular do tipo epitelióide, sendo 55% (11/20) da cavidade oral e 95% (19/20) cutâneos.

Nos melanomas cutâneos a pigmentação e a presença de atividade juncional apresentaram-se associadas ( $p = 0,0006$ ), sendo 75% (15/20) dos casos analisados melanóticos e 60% (12/20) sem comprometimento da epiderme. Mais da metade dos casos (55%, 11/20) possuíam ulceração e 60% (12/20) apresentavam êmbolo e desmoplasia simultaneamente. Nos melanomas orais a maioria eram melanóticos (65%, 13/20), quase a totalidade apresentavam ulceração (95%, 19/20), em 65% (13/20) observou-se desmoplasia. Na metade dos casos (50%, 10/20) a atividade juncional não encontrava-se presente e 45% (9/20) não apresentavam êmbolo neoplásico.

### *Expressão das Metaloproteinases 9 e 14*

Nos melanomas cutâneos a expressão imunohistoquímica para MMP-14 (Fig.1A e 1B) foi encontrada em todos os tumores (20/20), com 75% (15/20) dos casos apresentando marcação em mais que 50% das células neoplásicas e ainda com intensidade de marcação moderada em 45% (9/20). A expressão imunohistoquímica para MMP-9 (Fig.1C e 1D) assim como

similarmente observada na MMP-14, também foi verificada em todos os casos (20/20), com a maioria dos casos (75%, 15/20) apresentando marcação em mais que 50% das células neoplásicas e intensidade de marcação moderada (Tabela 2).

Nos melanomas orais a expressão imunohistoquímica para MMP-14 (Fig. 2<sup>a</sup> e 2B) foi encontrada em todos os tumores (20/20), com 65% dos casos (13/20) apresentando marcação em mais que 50% das células neoplásicas e em 45% (9/20) intensidade de marcação moderada. A expressão imunohistoquímica para MMP-9 (Fig. 2C e 2D) foi observada em todos os casos (20/20) com a maioria de casos (60%, 12/20) com marcação em mais que 50% das células neoplásicas e intensidade de marcação moderada em 40% (8/20) (Tabela 2).

#### *Relação entre a expressão de Metaloproteinase 9 e 14 e características histológicas*

Ao avaliarmos nos casos cutâneos a expressão de MMP-9 com características histológicas, observamos que a elevação do percentual de células marcadas está relacionada com a presença de ulceração ( $p=0.0063$ ;  $r= 0.6024$ ), assim como a intensidade de marcação com a presença de desmoplasia ( $p= 0.0396$ ;  $r= 0.4756$ ). Com relação a MMP-14, o aumento do percentual de células marcadas esteve associada à ausência de atividade juncional ( $p= 0.019$ ;  $r= - 0.5641$ ), já a intensidade de marcação apresentou-se associada à presença de êmbolos ( $p= 0.0134$ ;  $r= 0.5860$ ).

No que se refere aos casos orais, foi observada uma relação direta entre a elevação do percentual de células marcadas para MMP-9 e MMP -14 ( $p= 0.0016$ ;  $r= 0.6585$ ). Ainda foi possível observar relação entre intensidade de marcação para MMP-9 com atividade juncional do tipo pagetóide ( $p= 0.0185$ ;  $r= 0.5803$ ) e índice de proliferação celular ( $p= 0.0386$ ;  $r= 0.5207$ ).

## **DISCUSSÃO**

O melanoma, apesar de ser menos frequente do que outras neoplasias de pele apresenta maior letalidade e agressividade (Miller 2006), devido a sua característica invasiva, com alta proliferação celular, capacidade replicativa aumentada e forte habilidade de disseminação metastática (Moretti et al. 2008).

Em circunstâncias normais, a matriz extracelular constitui uma das barreiras contra a disseminação do tumor (Cauwe et al. 2007), entretanto durante a progressão neoplásica o remodelamento da MEC e degradação de membranas basais, receptores de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular, ligantes apoptóticos e fatores angiogênicos, por metaloproteinasas é uma etapa fundamental para a formação de metástases (Gialeli et al. 2011).

A expressão da maioria das MMPs é baixa ou indetectável em tecidos normais, portanto a regulação positiva de sua expressão em neoplasias é interpretada como indicativo de que estão ativadas em células tumorais e tecidos circundantes (Kondratiev et al. 2008). No melanoma humano as metaloproteinasas encontram-se superexpressas em resposta à transformação celular oncogênica, citocinas e vários fatores de crescimento e angiogênicos (DoCampo et al. 2011), ademais o aumento na sua expressão está relacionado *in vitro* e *in vivo* a migração, invasão, crescimento celular e comportamento mais agressivo (Simpson et al. 2013). Nossos dados demonstram que todos os casos estudados apresentaram imunomarcagem para MMP, bem como alta frequência de casos com elevada expressão de metaloproteinase 9 e 14, similarmente ao observado na contraparte humana.

Evidenciamos nos casos cutâneos a relação da MMP-14 com a presença de êmbolos, e nos casos orais a relação da MMP-9 com a proliferação celular. Na literatura são encontrados trabalhos demonstrando que durante a etapa de degradação dos componentes da MEC fragmentos solúveis com bioatividades são gerados e estimulam vias ligadas ao aumento da proliferação neoplásica, intravasamento em circulação sanguínea e consequente formação de êmbolos neoplásicos e migração para sítios metastáticos (Joyce & Pollard 2007, López-Otín et al. 2009, Gialeli et al. 2011). Além disso, uma etapa facilitadora de embolização vascular e metástases é a agregação plaquetária em torno do êmbolo de células neoplásicas induzida pelo tumor, tal agregação é dependente da ativação da MMP-2 pela MMP-14 (Levin 1995).

Encontramos nas lesões cutâneas a relação entre o aumento na expressão de MMP-9 com a presença de ulceração, sendo por definição ulceração a ausência de epiderme intacta sobre uma porção significativa do tumor primário (Balch 1980). O mecanismo para a compreensão deste evento ainda não é esclarecido e aparentemente pode estar relacionado à diminuição do suprimento sanguíneo pela rápida expansão tumoral na derme, e ainda a fragilidade e consequente ruptura da epiderme devido a infiltração neoplásica (Sarpa et al. 2006). É

possível que as MMPs estejam relacionadas nesse processo ainda que sejam escassos estudos sobre o tema.

Ao analisar a expressão de MMPs com características histológicas, foi observada uma relação inversa de MMP-14 com atividade juncional nos casos cutâneos, e nos orais uma relação positiva com a MMP-9. Caracteriza atividade juncional a proliferação de melanócitos neoplásicos na interface entre a epiderme e derme (Goldschmidt et al. 1998). É comum em lesões melanocíticas humanas, sendo em lesões benignas relacionada à formação de nevos (Smedley et al. 2011), em melanomas acredita-se que esteja relacionada à fase de crescimento vertical em que as células neoplásicas ganham propriedades invasivas com acometimento das camadas inferiores da derme e hipoderme (Clark et al. 1984). No melanoma canino sua presença é comumente observada e de forma semelhante ao melanoma humano, aparentemente relacionada à fase de crescimento vertical (Spangler & Kass 2006), com possível papel facilitador das MMPs nesse processo, entretanto não existem evidências significativas na literatura e sua relevância continua obscura.

Na espécie canina, o melanoma é o tumor maligno mais comum da cavidade oral (Bergman 2007), altamente agressivo, com invasão local nos ossos e metástases para os linfonodos regionais (Williams & Packer 2003). Historicamente diversos estudos confirmam que o melanoma da cavidade oral tem um pior prognóstico quando comparado ao cutâneo, com uma menor sobrevida dependendo de características do tumor (Dennis et al. 2006, Liptak & Withrow 2013, Boston et al. 2014). Histologicamente em melanomas orais e cutâneos observa-se necrose, infiltrado inflamatório associado, desmoplasia e ainda presença de ulceração, alta proliferação celular e êmbolos neoplásicos, características essas últimas que indicam maior agressividade tumoral (Smith et al. 2002) e que apresentam-se mais frequentes em lesões orais.

Baseado na literatura e diante dos casos estudados é possível inferir que em melanomas caninos cutâneos, provavelmente a metaloproteinase 14 está associada a características histológicas de agressividade, enquanto em melanomas orais caninos esta associação ocorre com a metaloproteinase 9.

Alguns marcadores prognósticos e preditivos são bem estabelecidos para avaliação tumoral e conduta de terapias anti-neoplásicas. Dentre esses marcadores destacam-se a avaliação do

índice mitótico, bem como da proliferação celular, localização do tumor e características histológicas como presença de êmbolos e ulceração. Nos melanomas, porém, devido sua heterogeneidade e conhecida resistências às terapias convencionais, torna-se um desafio já que não existem protocolos determinados ou mesmo terapias-alvo. Desse modo, estabelecimento de novos parâmetros que auxiliarão o estadiamento e acompanhamento são importantes para elucidação de possíveis rotas terapêuticas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, R.V.S. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- ARRANGOIZ, R. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, n. 1, p. 1, 2016.
- BALCH, C.M. et al. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. **Cancer**, n.45, p.3012-3017, 1980.
- BASSET, P. et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 699-704, 1990.
- BERGMAN, P.J. Canine Oral Melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, p. 55–60, 2007.
- BERGMAN, P.J.; Kent, M.S.; Farese, J.P. Melanoma. In: **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Elsevier Saunders: St. Louis, MO, USA, p. 321–334, 2013.
- BOSTON, S.E. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n.4, p. 401-407, 2014.
- BRAMHALL, S.R. et al. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 182, n. 3, p. 347-355, 1997.
- CAUWE, B. et al. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, p. 113-85, 2007.
- CLARK, W. H. et al. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, 1984.
- DE GROEF, L. et al. MMPs in the neuroretina and optic nerve: Modulators of glaucoma pathogenesis and repair?. **Investigative ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 3, p. 1953-1964, 2014.

- DENNIS, M. et al. Frequency of and risk factors associated with lingual lesions in dogs: 1196 cases (1995–2004). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, p. 1533–1537, 2006.
- DOCAMPO, M.J. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, p. 1087–1096, 2011.
- ENGBRING, J.A.; KLEINMAN, H.K. The basement membrane matrix in malignancy. **The Journal of Pathology**, v. 200, p. 465–470, 2003.
- GIALELI, C. et al. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **FEBS Journal**, v. 278, n. 1, p. 16-27, 2011.
- GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**, v. 2, p. 38–50, 1998.
- GROSS, T.L. et al. Clinical and histopathological diagnosis. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat**. 2th ed. Blackwell Publishing, p.406–410. 2005.
- HOFMANN, U.B. et al. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 337-344, 2000.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. INCA - **Instituto Nacional de Câncer - Estimativas 2018**, p. 54-56, 2018.
- JOYCE, J.A. & POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-52, 2009.
- KONDRATIEV, S. et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. **Human Pathology**, v. 39, n. 3, p. 337–343, 2008.
- LEVIN, E.R. Endothelins. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, n.6, p. 356-63, 1995.
- LIPTAK, J.M.; WITHROW, S.J. Cancer of gastrointestinal tract. In: **Small Animal Clinical Oncology**, 5<sup>th</sup> ed.; Elsevier Saunders: St. Louis, MO, USA, p. 381–395, 2013.
- LÓPEZ-OTÍN, C. et al. Protective roles of matrix metallopro- teinases: From mouse models to human cancer. **Cell Cycle**,v. 8, n. 22, p.3657-62, 2009.
- MCDONNELL, S. et al. Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas. **Molecular Carcinogenesis**, v. 4, n. 6, p. 527-533, 1991.
- MILLER, A.J. & MIHM, M.C. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 2006.

MORETTI, R.M. et al. Gonadotropin-releasing hormone agonists suppress melanoma cell motility and invasiveness through the inhibition of  $\alpha 3$  integrin and MMP-2 expression and activity. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 2, p. 405-13, 2008.

NABESHIMA, K. et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, n. 4, p. 255-264, 2002.

OMHOLT, K. et al. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. **Clinical Cancer Research**, v.10, n. 12, p. 3933–3942, 2011.

PIRES, I. et al. MMP-2 and MMP-9 Expression in Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Evidence of a Relationship with Tumoral Malignancy. **In: Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**. IntechOpen, 2013.

SARPA, H.G. et al. Prognostic Significance of Extent of Ulceration in Primary Cutaneous Melanoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 30, n. 11, p. 1396-400, 2006.

SIMPSON, R.M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a pre-clinical model for human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v.27, n.1, p.37- 47, 2013.

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

SMITH, H. et al. A Comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 9, p. 651–678, 2002.

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

STERNLICHT, M.D. & WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.17, p. 463–516, 2001.

VISSE, R. & NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

WILLIAMS, L.E. & PACKER, R.A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 1234–1236, 2003.

### Tabelas

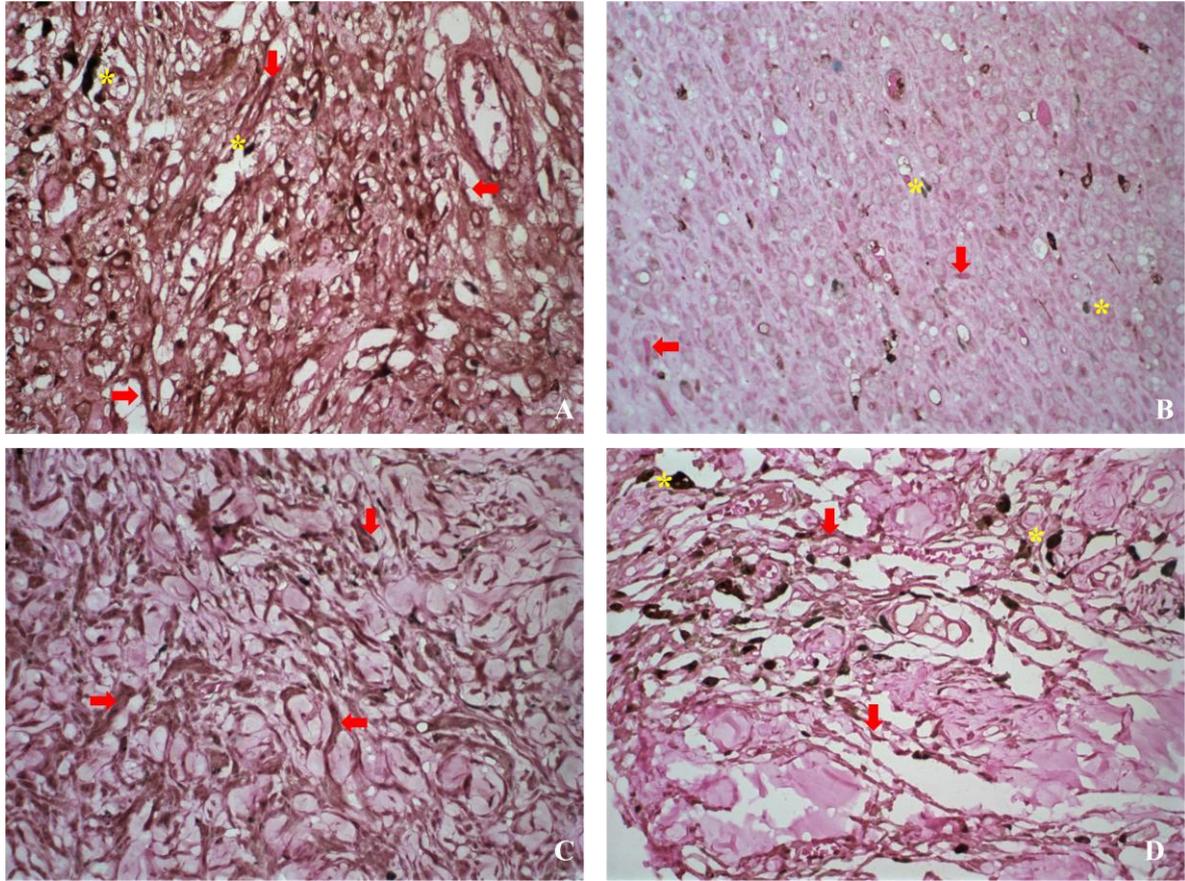
**Tabela 1.** Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário utilizados na técnica de imunohistoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tempo de incubação</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
<b>Melan-A</b>	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melanoma Antigen</b>	Santa Cruz	PNL-2	1:100	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Ki67</b>	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
<b>MMP-9</b>	Abcam	EP1254	1:100	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink
<b>MMP-14</b>	Abcam	Policlonal	1:50	16h	Citrato + Calor úmido pressurizado	Novolink

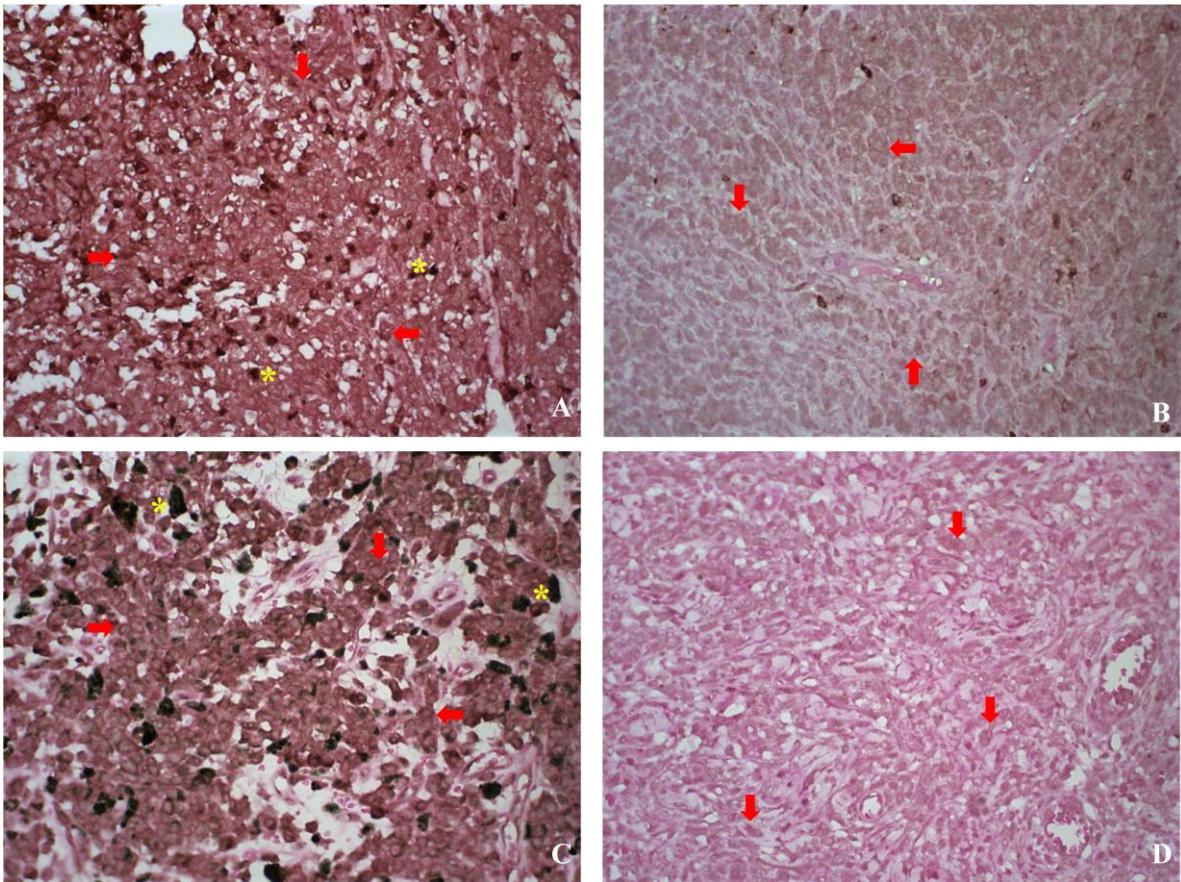
**Tabela 2.** Percentual da expressão de metaloproteinase 9 e 14 analisadas por localização tumoral.

<b>Distribuição de Metaloproteinase 9 e 14</b>				
	<b>CUTÂNEO (N=20)</b>		<b>ORAL (N=20)</b>	
	<i>MMP9</i>	<i>MMP14</i>	<i>MMP9</i>	<i>MMP14</i>
<b>Escore</b>				
0	0%	0%	5%	25%
1	5%	5%	20%	10%
2	20%	30%	15%	15%
3	75%	65%	60%	50%
<b>Intensidade</b>				
0	0%	0%	0%	15%
1	10%	35%	30%	40%
2	75%	45%	40%	45%
3	15%	20%	30%	0%

### Figuras e legendas



**Figura 1. Fragmento de melanoma cutâneo canino, imunohistoquímica para MMP-9 e MMP-14; imunomarcção com revelação pelo DAB. Contra-coloração com Giemsa. A)** Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática forte para MMP-9 em > 50% das células neoplásicas (seta). Asterisco: área de pigmentação melânica. 40X. **B)** Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática fraca para MMP-9 em < 50% das células neoplásicas (seta). Asterisco: área de pigmentação melânica. 40X. **C)** Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática forte para MMP-14 em > 50% das células neoplásicas (seta). 40X. **D)** Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática fraca para MMP-14 em 21-49% das células neoplásicas. 40X.



**Figura 2. Fragmento de melanoma oral canino, imunohistoquímica para MMP-9 e MMP-14; imunomarcção com revelação pelo DAB. Contra-coloração com Giemsa. A)** Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática moderada a forte para MMP-9 em  $> 50\%$  das células neoplásicas (seta). Asterisco: área de pigmentação melânica. 40X. **B)** Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática fraca para MMP-9 em  $< 50\%$  das células neoplásicas (seta). 40X. **C)** Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática forte para MMP-14 em  $> 50\%$  das células neoplásicas (seta). Asterisco: área de pigmentação melânica. 40X. **D)** Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática fraca para MMP-14 em 21-49% das células neoplásicas (seta). 40X.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melanoma é reconhecidamente uma neoplasia agressiva, com baixa resposta terapêutica, grande capacidade invasiva e migratória, favorecendo a formação de metástases. Na medicina veterinária o quadro apresenta-se de forma semelhante, com o agravante do diagnóstico ser realizado mais tardiamente do que em humanos.

As características de agressividade observadas em neoplasias são associadas a sua capacidade de invadir o tecido adjacente, bem como promover a disseminação metastática. Essa etapa de invasão requer a degradação da matriz extracelular pela ação das metaloproteinasas, que superexpressas favorecem o estabelecimento de um meio permissivo para progressão tumoral, invasão e disseminação. Este evento é bem descrito em diversas neoplasias humanas e também em algumas neoplasias caninas, porém no melanoma canino pouco se conhece sobre seus efeitos.

Nossos dados demonstram que em melanomas caninos as MMPs encontram-se superexpressas e relacionadas às características de agressividade e progressão tumoral, como presença de ulceração e êmbolos, bem como de proliferação celular. Na literatura são encontrados trabalhos demonstrando que durante a etapa de degradação dos componentes da MEC fragmentos são gerados e estimulam vias envolvidas na proliferação celular neoplásica, intravasamento em circulação sanguínea e eventual formação de êmbolos neoplásicos e migração para sítios metastáticos. Outros estudos especulam que MMPs podem facilitar a embolização vascular e formação de metástases por meio da agregação plaquetária em torno do êmbolo de células neoplásicas, tal agregação seria dependente da ativação da MMP-2 pela MMP-14.

Entender a regulação das MMPs no melanoma fornece novas alternativas para a propedêutica e conduta de tratamento. Por essa razão, trabalhos que busquem associar a expressão dessa proteína com parâmetros de agressividade e sobrevida dos animais acometidos pela neoplasia são essenciais para a determinação de seu possível valor prognóstico. Entretanto, uma dificuldade observada na medicina veterinária é a difícil rastreabilidade dos pacientes e seus tutores e ainda a determinação do óbito.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, N. R., et al. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 292, n. 22, p. 2771-2776, 2004.
- ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC Supplements**, v. II, p. 81-91, 2013.
- ARAÚJO, R.V.S. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 1, p. 82-88, 2011.
- ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, p. 1-15, 2016.
- AUNG, P. P. et al. KBA62 and PNL2: two newer melanoma markers - immunohistochemical analysis of 1563 tumors including metastatic, desmoplastic, and mucosal melanomas and their mimics. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 265–272, 2012.
- BALCH,C.M. et al. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. **Cancer**,n.45,p.3012-3017, 1980.
- BARUTELLO, G. et al. Strengths and Weaknesses of Pre-Clinical Models for Human Melanoma Treatment: Dawn of Dogs' Revolution for Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 799, 2018.
- BERGIN, I. L. et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41–53, 2011.
- BERGMAN, P. J. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. (Eds.). **Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. p. 321–334, 2013.
- BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 172, n. 5, p. 902–908, 1970.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2–11, 2002.
- BUGDAYCI, G. et al. Matrix metalloproteinase-9 in broncho-alveolar lavage fluid of patients with non-small cell lung cancer. **Experimental oncology**,v. 28, n.2, p. 169-171, 2006.
- 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**, v. 45, n. 2, p. 138-152, 2008.
- CANGUL, I.T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. **Veterinary Science Tomorrow**, v. 4, p. 1-19, 2001.

CHAUDHARY, A. et al. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. **Journal of Biomedical Science**, v.17, n. 10, 2010.

CHI, H.-I. et al. Epithelioid cell melanomas have greater DNA ploidy abnormalities than spindle cell melanomas: cytological evidence for a higher malignant potential of the former. **Archives of dermatological research**, v. 285, n. 7, p. 410-414, 1993.

CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1969.

CLARK, W. H. et al. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, 1984.

COULIE, P. G. et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 1, p. 35–42, 1994.

CURTIN, J.A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135-2147, 2005.

DE GROEF, L. et al. MMPs in the neuroretina and optic nerve: Modulators of glaucoma pathogenesis and repair?. **Investigative ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 3, p. 1953-1964, 2014.

DE MAZIERE, A. M. et al. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. **Traffic**, v. 3, n. 9, p. 678–693, 2002.

DER WEYDEN, L. et al. Cross-species models of human melanoma. **Journal of Pathology**, v. 238, p. 152-165, 2016.

DOCAMPO, M.J. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and membrane-type 1 matrix metalloproteinase in melanocytic tumors of dogs and canine melanoma cell lines. **American Journal of Veterinary Research**, v.72, n.8, p.1087-1096, 2011.

DONG, Y. et al. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to alpha-melanocyte-stimulating hormone by upregulating melanocortin-1 receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 4, p. 849-853, 2010.

DZUTSEV, A. et al. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. **European Journal of Immunology**, v. 45, p. 17–31, 2015.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression, **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p.161-174, 2002.

ENGBRING, J.A.; KLEINMAN, H.K. The basement membrane matrix in malignancy, **Journal of Pathology**, v. 200, p. 465-470, 2003.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-2917, 2010.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns: GLOBOCAN 2012. **The International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2015.

FITZPATRICK, T. B., The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.

FRIEDMAN, R. J.; RIGEL, D.S.; KOPF, A.W. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 35, n.3, p. 130-151, 1985.

GILLES, C. et al. Matrix metalloproteases and epithelial-to-mesenchymal transition: implications for carcinoma metastasis. In: Savagner P, editor. **Rise and Fall of Epithelial Phenotype**, p. 233-251, 2004.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**, v. 2, p. 38–50, 1998.

GOLDSCHMIDT, M.H. & HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues,. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4<sup>th</sup> ed. Iowa State Press, Ames, p.45-118, 2002.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-857, 2007.

GROSS, T.L. et al. Clinical and histopatological diagnosis. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat**. 2<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing, p.406–410. 2005.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.; HERLYN, M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, v. 35, n. 3, p. 309-318, 2004.

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

HEAD, K.W.; ELSE, R.W.; DUBIELZIG, R.R. Tumors of the Alimentary Tract. In: **Tumors in Domestic Animals**, 4<sup>a</sup> Edição, p. 426–430, 2002.

HOFMANN, U.B. et al. Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 15, n. 3, p. 337-344, 2000.

HOFMANN, U.B. et al. Role of matrix metallopro- teinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v.87, n. 3-4, p. 307-314, 2005.

JIMBOW, K. et al. Some aspects of melanin biology: 1950–1975. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, n. 1, p. 72–89, 1976.

KAJITA, M. et al. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration **Journal of Cell Biology**, v. 153, p. 893-904, 2001.

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

KAWAKAMI, Y. et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 9, p. 3515–3519, 1994.

KHANNA, C. et al. The dog as a cancer model. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 1065–1066, 2006.

KING, R. Lentiginous melanoma. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 3, p. 337-341, 2011.

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

LEBOIT, F.E. et al. World health organization classifications of tumors. In: Pathology and genetics of skin tumors. **International Agency for Research on Cancer**, 3ª Edição, v. 6, 2006.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, p. 803–819, 2005.

LITTLE, E. G.; EIDE, M.J. Update on the current state of melanoma incidence. **Dermatologic Clinics**, v. 30, n. 3, p. 355-361, 2012.

LYN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, p. 843-850, 2007.

MACEDO PASCHOAL, F. et al. Melanoma desmoplástico. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 1, 2012.

MACEWEN, E.G. et al. Canine oral melanoma: Comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. **Cancer Investigation**, v. 4, p. 397–402, 1986.

MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of Matrix metalloproteinases. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v.47, n.1, p.27-58, 2012.

MARKOVIC, S.N. et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 82, n. 3. p. 364-380, 2007.

MCCLAIN, S.E. et al. Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n.4, p. 420-426, 2012.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Human Genetics**, v. 126, n. 4, p. 499-510, 2009.

- MIYA, K. et al. Interpreting Gelatinase Activity in Tumor Tissue and Serum as a Prognostic Marker of Naturally Developing Canine Tumors. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, n.8, p.769-775, 2005.
- MODIANO, J.F.; RITT, M.G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: Pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 163–174, 1999.
- MORRIS, L. G. et al. PNL2 melanocytic marker in immunohistochemical evaluation of primary mucosal melanoma of the head and neck. **Head & Neck**, v. 30, n. 6, p. 771–775, 2008.
- MYLONA, E. et al. The clinicopathological and prognostic significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and MMP-9 according to their localization in invasive breast carcinoma. **Histopathology**, v. 50, n.3, p. 338-347, 2007.
- NABESHIMA, K. et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, n. 4, p. 255-264, 2002.
- NAKAICHI, M. et al. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. **Research in Veterinary Science**, v.82, n.2, p. 271-279, 2007.
- NISHIYA, A. et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v.3, n. 1, p. 7, 2016.
- OMHOLT, K. et al. KIT pathway alterations in mucosal melanomas of the vulva and other sites. **Clinical Cancer Research**, v.10, n. 12, p. 3933–3942, 2011.
- ORLOW ,S.J. et al. High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 103, p. 196-201, 1994.
- OVERALL, C.M.; KLEIFELD, O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti- targets for cancer therapy. **Nature**, v. 6, p. 227-239, 2006.
- PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews**, v. 8, 2008.
- PAYETTE, M.J. et al. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 1, p. 53-74, 2009.
- PIRES, I. et al. MMP-2 and MMP-9 Expression in Canine Cutaneous Melanocytic Tumours: Evidence of a Relationship with Tumoral Malignancy. **In: Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**. IntechOpen, 2013.
- RAMOS-VARA, J.A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

- RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. In: **In vivo**, n. 28, p. 105-1012, 2014.
- REDONDO, P. et al. Expression and serum levels of MMP-2 and MMP-9 during human melanoma progression. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.30, n.5, p.541-545, 2005.
- ROCHAIX, P. et al. PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. **Modern Pathology**, v. 16, n. 5, p. 481–490, 2003.
- ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340–346, 2012.
- SAKAKIBARA, M. et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma, **Cancer**, v. 85, p. 231-239, 1999.
- SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature Reviews**, v. 1, 2015.
- SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v. 451. n. 7176, p. 345–349, 2008.
- SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer: a review. **Mutation Research**, v. 705, n. 2, p. 141-153, 2010.
- SCHNEIDERHAN, W. et al. Pancreatic stellate cells are an important source of MMP-2 in human pancreatic cancer and accelerate tumor progression in a murine xenograft model and CAM assay. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 3, p. 512- 519, 2007.
- SCHULTHEISS, P. C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 422–425, 2006.
- SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, v. 36, n. 3, p. 256–263, 2000.
- SELTZER, J.L.; EISEN, A.Z. The Role of Extracellular Matrix Metalloproteinases in Connective Tissue Remodeling. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, editores. **Dermatology in General Medicine**. 6ª edição, p. 200-209, 2003.
- SIMONETTI, O. et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. **Cancer**, v.95, p.1963-1970, 2002.
- SIMPSON, R.M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a pre-clinical model for human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v.27, n.1, p.37- 47, 2013.

- SITUM, M. et al. Melanoma—clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. **Acta Dermatovenerologica Croatica**, v. 22, n. 1, p. 2-2, 2014.
- SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.
- SOUNNI, N.E.; NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, v. 87, p. 329-342, 2005.
- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 463-516, 2001.
- TAJIMA, S.; URA-ISHIKO, A., HAYASHI, A. Melanogenesis, biosynthetic phenotype of fibronectin and collagen, and migrating activity in cloned B16 mouse melanoma cells. **The Journal of Dermatological Science**, v. 12, n. 1, p. 24-30, 1996.
- TEIXEIRA, T. F. et al. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 2, p. 100–104, 2010.
- TEIXEIRA, T. F. et al. Cell proliferation and expression of connexins differ in melanotic and amelanotic canine oral melanomas. **Veterinary Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 29-38, 2014.
- THOMPSON, J.F.; SCOLYER, R.A.; KEFFORD, R.F. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.
- UENO, T. et al. Significance of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in various liver diseases. **Journal of Hepatology**, v.24, p.177-184, 1996.
- VAISANEN, A. et al. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72 kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. **Journal of Pathology**, v. 186, n. 1, p. 51-58, 1998.
- VAN-WART, H.E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential activity to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 5578-5582, 1990.
- WEI, S. et al. Protein engineering of the tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) inhibitory domain. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.11, p.9831-9834, 2003.
- WEINSTEIN, D et al. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**. v. 7, n. 6, p. 13–24, 2014.
- WEISSINGER, S.E. et al. A diagnostic algorithm to distinguish desmoplastic from spindle cell melanoma. **Modern Pathology**, v. 27, n. 4, p. 524, 2014.
- WILLIAMS, L.E.; PACKER, R.A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 1234–1236, 2004.

WILSON, S. et al. Evaluation of the accuracy of serum MMP-9 as a test for colorectal cancer in a primary care population. **BMC Cancer** ,v. 6, p. 258, 2006.

YOKOTA, T. et al. Pancreatic stellate cell activation and MMP production in experimental pancreatic fibrosis. **Journal of Surgical Research**, v.104, p. 106-111, 2002.

ZHENG, H. et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. **Anticancer Research**, v.26, n. 5A, p.3579-3583, 2006.

## 6. ANEXOS

### Anexo A. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA/CEUA.

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p><b>CERTIFICADO/CERTIFICATE</b></p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 008/2016, relativo ao projeto intitulado “<i>Expressão gênica e protéica de marcadores prognósticos nos melanomas caninos cutâneos e oral</i>”, que tem como responsável Enio Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 21/03/2016. Este certificado expira-se em 20/03/2021.</p>	
<p><b><u>Aprovada a prorrogação até 20/03/2023 -(reunião de 01/07/2019)</u></b></p>	
<p>We hereby certify that the Protocol nº. 008/2016, related to the Project entitled “<i>Gene and protein expression of prognostic markers in skin and oral canine melanomas</i>”, under the supervision of Enio Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 03/21/2016. This certificate expires in 03/20/2021.</p>	
<p><b><u>New valid date: March 20/2023 – (Approve by CEUA in 07/01/2019)</u></b></p>	
<p>Belo Horizonte, 01/07/2019.</p>	
<p>Marcelo Resende de Souza Coordenador da CEUA/UFMG</p>	
<p>Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005, CEP-31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil - Telefone: (31) 3409-4516 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:cetea@propro.ufmg.br">cetea@propro.ufmg.br</a></p>	

## 7. APÊNDICE

### 7.1 ) Apresentação de trabalhos científicos em eventos:

**Apêndice A.** Evento: XVI Encontro Mineiro de Biomedicina- XVI EMBM.



Apêndice B. Evento: X Oncovet.

# X ONCOVet

## 2019

Certificamos que Lima, B. M. apresentou o Trabalho Científico intitulado “EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASE-9 E SUA RELAÇÃO COM QUANTIFICAÇÃO DE COLÁGENO TIPO I/III EM MELANOMAS CANINOS”, de autoria de “Lima, B. M., Carvalho, B. A., Veloso, E. S., Vieira, D.S., Cassali, G.D., Del Puerto, H.L., Ferreira, E., no X ONCOVET, organizado pela Associação Brasileira de Oncologia Veterinária – ABROVET em parceria com a Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão - Funep, realizado na UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, no período de 30 de abril a 03 de maio de 2019.

Belo Horizonte, 03 de maio de 2019.

Prof. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli  
Presidente da ABROVET

Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi  
Diretor Científico da ABROVET

Profa. Dra. Maria Cristina Thomaz  
Diretora-Presidente da Funep

Certificado registrado sob o nº 83436

**7.2 ) Prêmio recebido:**

**Apêndice A.** Menção Honrosa - Evento: XVI Encontro Mineiro de Biomedicina- XVI EMBM.

