

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BÁRBARA ANDRADE DE CARVALHO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE E SUA RELAÇÃO
COM O ÍNDICE PROLIFERATIVO EM MELANOMAS CANINOS**

Belo Horizonte

Fevereiro de 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE E SUA RELAÇÃO
COM O ÍNDICE PROLIFERATIVO EM MELANOMAS CANINOS**

Belo Horizonte

Fevereiro de 2019

Bárbara Andrade de Carvalho

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE E SUA RELAÇÃO
COM O ÍNDICE PROLIFERATIVO EM MELANOMAS CANINOS**

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

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

Fevereiro de 2019

C331e Carvalho, Bárbara Andrade de.
Expressão de proteínas envolvidas na apoptose e sua relação com o índice proliferativo em melanomas caninos [manuscrito]. / Bárbara Andrade de Carvalho. - - Belo Horizonte: 2019.
67f.: 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. 2. Imuno-Histoquímica. 3. Doenças do Cão. 4. Apoptose. 5. Proteína X Associada a bcl-2. 6. Caspase 3. 7. Caspase 9. 8. Antígeno Ki-67. 9. Dissertação Acadêmica. I. Ferreira, Enio. II. Puerto, Helen Lima Del. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 375j

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA BARBARA ANDRADE DE CARVALHO

Realizou-se, no dia 21 de fevereiro de 2019, às 09:00 horas, ICB/UFMG - BLOCO C, 3 ANDAR, SALA 241, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA APOPTOSE E SUA RELAÇÃO COM O ÍNDICE PROLIFERATIVO EM MELANOMAS CANINOS*, apresentada por BARBARA ANDRADE DE CARVALHO, número de registro 2017668111, graduada no curso de BIOMEDICINA-NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof Enio Ferreira - Orientador (UFMG), Profa. Helen Lima Del Puerto (UFMG), Profa. Paula Peixoto Campos Lopes (UFMG), Prof. Dalton Dittz Júnior (Centro Universitário UNA).

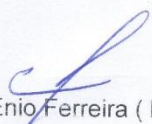
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2019.


Prof(a). Enio Ferreira (Doutor)


Prof(a). Helen Lima Del Puerto (Doutora)


Prof(a). Paula Peixoto Campos Lopes (Doutora)


Prof(a). Dalton Dittz Júnior (Doutor)

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento a Deus, dono de toda minha vida e de todos os meus passos. Que mesmo quando minha humanidade não entende Suas decisões, me possibilita ter uma vida maravilhosa e me mostra todos os dias o quão abençoado sou, me fazendo repetir “a tudo dai graças” mesmo nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, donos do maior e mais verdadeiro clichê: “minha base”. Eles quem acreditaram e me apoiaram em todos os meus sonhos e momentos de desespero. À minha irmã, que mesmo com nossas tantas diferenças sempre mostra o maior carinho e admiração por todos os meus passos.

Ao meu querido orientador, Enio, que me deu a mão em um dos momentos mais difíceis de toda minha caminhada e a fez muito mais leve, divertida e confiante, se tornando, além de professor, amigo, psicólogo e até pai. Seu carinho e humanidade, mesmo que às vezes disfarçado de brincadeira, são admiráveis e um exemplo pra mim como profissional e ser humano.

À Helen, minha querida coorientadora. Sempre disponível, com uma gentileza e um amor que só as mães têm, para todas as dúvidas científicas e também para os momentos de angústia da vida pessoal.

Aos meus amadinhos colegas de pós-graduação do LCC, Bruna Lima, Camila Almeida, Emerson Soares e Felipe Fontoura, por me receberem de uma maneira surpreendente e serem meu apoio de trabalho e emocional. A companhia e amizade de vocês é um dos maiores presentes do mestrado. Obrigada pela companhia e por tornar os meus dias bem mais fáceis e alegres.

Às minhas amigas conquistadas nessa vida da patologia, Eliana Toscano, Edna Gomez e Luiza Cioglia, pois mesmo como percalços do caminho sempre estiveram ao meu lado e não deixarem o carinho e amizade entre nós diminuir.

Aos colabores, professora Paula Peixoto e professor Giovanni Cassali, por cederem com grande gentileza estrutura e materiais necessários para que os projeto fosse realizado.

À toda equipe do LCC, meus meninos da IC, futuros colegas da pós e agregados, e do LPC, em especial à Aline, que se tornou uma grande amiga, por compartilharem os fardos dos dias de trabalho e todo conhecimento adquirido.

Aos meus amigos e familiares, por entenderem os meus dias ausentes e sempre me apoiarem nos meus sonhos.

A todos colegas, professores e profissionais, que estiveram comigo durante essa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e como ser humano.

Muito obrigada, de verdade!

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

RESUMO

O melanoma é reconhecidamente uma neoplasia extremamente agressiva, apesar de uma morbidade não tão significativa entre os cânceres de pele, possui alta taxa de mortalidade, 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 estudos comparativos de desenvolvimento e progressão neoplásica. Sabe-se que um importante parâmetro de agressividade tumoral é o índice proliferativo e apoptótico, onde tumores mais agressivos devem apresentar maiores taxas de proliferação celular e menores taxas de apoptose. Nesse contexto, é descrito que a resistência a apoptose é uma característica importante relacionada ao desenvolvimento tumoral. O estudo da apoptose, evento ainda pouco compreendido em melanomas, pode auxiliar na compreensão sobre agressividade e progressão desses tumores. Assim, esse trabalho tem como objetivo caracterizar e correlacionar a expressão imunohistoquímica de Ki67, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada, bem como com as características histopatológicas observadas em melanomas caninos. Foram selecionados 40 casos de melanomas caninos cutâneos e orais, para avaliação histopatológica (presença de êmbolo, desmoplasia, atividade juncional, índice mitótico, ulceração) e realização da técnica de imunohistoquímica. Entre os marcadores, Ki67 se correlacionou apenas com a expressão de Bax, de forma positiva, Bcl-2 foi relacionado positivamente com Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada e a elevação da expressão de Caspase-3 clivada está relacionada ao aumento da expressão de Caspase-9 clivada. Observou-se diferença significativa quando associados os grupos de baixa e alta expressão de Ki67 e os grupos de baixa e alta expressão de Caspase-3 clivada (35% dos casos com baixas expressões de ambos marcadores). Entre os grupos oral e cutâneo, o segundo apresentou uma maior expressão de Caspase-9 clivada. Não foi encontrada nenhuma associação entre o índice mitótico, as características histológicas e os grupos de alta e baixa expressão dos marcadores imuno-histoquímicos estudados. Assim, nosso trabalho evidenciou que uma maior proliferação celular e uma maior expressão de proteínas anti-apoptóticas estão relacionadas a um aumento da expressão de proteínas pró apoptóticas. Foi observado também que melanomas orais, tido como mais agressivos, apresentam menor expressão de proteína indutora da cascata de apoptose quando comparado aos melanomas cutâneos.

PALAVRAS-CHAVES: melanoma, imunohistoquímica, cão, apoptose, Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, Ki67.

ABSTRACT

Melanoma is an extremely aggressive neoplasm, although its morbidity is not so significant among skin cancers. It has a high mortality rate in both human and veterinary medicine. In addition, canine melanoma, due to its histopathological and molecular characteristics similar to the human ones, is considered a good model for comparative studies of development and neoplastic progression. It is known that an important parameter of tumor aggressiveness is the proliferative and apoptotic index, where more aggressive tumors must present higher rates of cell proliferation and lower rates of apoptosis. In this context, resistance to apoptosis is described as an important feature related to tumor development. The study of apoptosis, an event still poorly understood in melanomas, may help in understanding the aggressiveness and progression of these tumors. Thus, this work aims to characterize and correlate the immunohistochemical expression of Ki67, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-3 cleaved and Caspase-9 cleaved, as well as the histopathological features observed in canine melanomas. We selected 40 cases of cutaneous and oral canine melanomas for histopathological evaluation (presence of plunger, desmoplasia, junctional activity, mitotic index, ulceration) and immunohistochemical technique. Among the biomarkers, Ki67 correlated only with Bax expression, positively, Bcl-2 was positively related to cleaved Caspase-3 and Caspase-9 cleaved, and the elevation of cleaved Caspase-3 expression is related to increased expression of Caspase-9 cleaved. Was observed a significant difference when the low and high Ki67 expression groups and the low and high expression groups of Caspase-3 cleaved (35% of cases with low expression of both biomarkers) were associated. Among the oral and cutaneous groups, the second presented a greater expression of Caspase-9 cleaved. No association was found between the mitotic index, the histological characteristics and the high and low expression groups of the immunohistochemical biomarkers studied. Thus, our work has shown that increased cell proliferation and increased expression of anti-apoptotic proteins are related to an increase in the expression of pro-apoptotic proteins. It was also observed that oral melanomas, considered to be more aggressive, have lower expression of apoptosis cascade inducing protein when compared to cutaneous melanomas.

KEYWORDS: melanoma, immunohistochemistry, dog, apoptosis, Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, Ki67.

LISTA DE FIGURAS

- Artigo: Figura 1 - Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão. Contra-coloração com Giemsa. 200X. Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática para Melan-A em mais de 10% das células neoplásicas..... 45
- Artigo: Figura 2 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear fraca e escassa para Ki67. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear forte e difusa para Ki67. C) Melanoma oral. Seta: imunomarcção nuclear fraca e escassa para Ki67. Asterisco: área de pigmentação melânica. D) Melanoma oral com imunomarcção nuclear forte e difusa para Ki67..... 46
- Artigo: Figura 3 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo.com rara imunomarcção fraca citoplasmática para Bcl-2. B) Melanoma cutâneo. Seta: imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para Bcl-2. C) Melanoma oral. Seta: imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e escassa para Bcl-2. B) Melanoma oral. Seta: imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para Bcl-2. Asterisco: área de pigmentação melânica..... 47
- Artigo: Figura 4 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo.com rara imunomarcção fraca, citoplasmática e nuclear para BAX. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática forte e difusa para BAX. C) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear fraca e escassa para BAX. D) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para BAX..... 48
- Artigo: Figura 5 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com algumas imunomarcções citoplasmáticas e nucleares fracas para Caspase-3. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3. C) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear fraca e escassa para Caspase-3. D) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3..... 49

Artigo: Figura 6 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com algumas imunomarcações citoplasmáticas e nucleares fracas para Caspase-3. B) Melanoma cutâneo com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3. C) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear fraca e escassa para Caspase-3. D) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3..... 50

Artigo: Figura 7 - Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa e Hematoxilina. A) Melanoma cutâneo com raras imunomarcações citoplasmáticas e nucleares fortes para Caspase-3 clivada. B) Melanoma cutâneo com imunomarcação citoplasmática e nuclear moderada e difusa para Caspase-3 clivada. C) Melanoma oral com rara imunomarcação citoplasmática e nuclear forte para Caspase-3 clivada. D) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3 clivada..... 51

Artigo: Figura 8 - Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Bax e Ki67 em amostras de melanomas caninos ($r = 0,3852$; $p < 0,05$)..... 52

Artigo: Figura 9 - Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-3 clivada e Bcl-2 em amostras de melanomas caninos ($r = 0,6113$; $p < 0,05$)..... 52

Artigo: Figura 10 - Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-9 clivada e Bcl-2 em amostras de melanomas caninos ($r = 0,5736$; $p < 0,05$)..... 53

Artigo: Figura 11 - Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-9 clivada e Caspase-3 clivada em amostras de melanomas caninos ($r = 0,6352$; $p < 0,05$)..... 53

Artigo: Figura 12 - Percentual médio de expressão de Caspase-9 clivada em melanomas caninos orais e cutâneos. Dados expressos por análises de média. Média grupo oral: $1,44\% \pm 1,15\%$; média do grupo: $3,49\% \pm 3,24\%$ ($p < 0,05$)..... 54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário segundo padronização prévia do grupo de pesquisa	26
Artigo: Tabela 1 - Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário.....	55
Artigo: Tabela 2. Percentual das características histológicas analisadas em todas as amostras.....	55
Artigo: Tabela 3. Percentual da expressão imuno-histoquímica em melanomas orais e caninos.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CEUA	Comissão de Ética no USO de Animais
DAB	3.3'-Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
Fapemig	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HE	Hematoxilina-eosina
HV-UFMG	Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais
ICB	Instituto de Ciências biológicas
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MPT	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial de Hidrogênio
TEM	Transição epitélio-mesênquima
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta

x	vezes
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 MELANOMA.....	15
2.2 MELANOMA CANINO.....	18
2.3 MARCADORES ONCOGÊNICOS EM MALANOMAS.....	19
2.4 APOPTOSE.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	24
4.2 CASOS.....	24
4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	25
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	25
4.5 AVALIAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	27
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
ARTIGO.....	29
6 CONCLUSÃO GERAL.....	57
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
9 ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Definido como uma neoplasia decorrente da transformação maligna dos melanócitos (ALI et al., 2013; FERLAY et al., 2010), o melanoma é um tipo de tumor que acomete principalmente a epiderme, trato uveal dos olhos e folículos capilares (SCHATTON et al., 2008). Nas últimas décadas sua incidência aumentou significativamente (ARMSTRONG & GOLDSTEIN, 2009; RASTRELLI et al., 2014) e apesar de ser menos frequente do que outras neoplasias de pele como carcinoma basocelular e de células escamosas, sua letalidade é mais elevada, devido sua característica altamente invasiva, causando mais que 75% das mortes por câncer de pele (ARRANGOIZ et al., 2016). No Brasil corresponde a 4% dos casos de câncer de pele e estima-se 6.260 novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2018). O diagnóstico do melanoma baseia-se principalmente nos achados clínicos e histopatológicos (ROLIM et al., 2012), onde se observa o padrão celular dos melanócitos e outras características como presença de ulceração, êmbolos, desmoplasia, atividade juncional e avaliação do índice mitótico (BERGIN et al., 2011; SCHULTHEISS, 2006; SMITH et al., 2002).

O melanoma, assim como em humanos, atinge também outras espécies, por isso, é amplamente utilizada como modelo de estudo comparativo (DELLA PORTA et al., 1995; KUSEWITT, 1996; LEY, 2002; OVERWIJK, 2001; SIMPSON et al., 2013). No cão é responsável por aproximadamente 7% das neoplasias malignas 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), sendo os orais sabidamente mais agressivos (BOSTON et al., 2014). Além disso, o modelo canino é tido como bom parâmetro de estudo comparativo, pela similaridade das características moleculares, histopatológicas e clínicas às observadas em humanos (SIMPSON et al., 2013).

O câncer é resultado de vários eventos genéticos e epigenéticos, sendo necessárias várias mutações celulares para a iniciação, promoção e progressão tumoral. Portanto, no processo de carcinogênese, as mutações são resultado de alterações no DNA, pela ativação de proto-oncogenes em oncogenes, e pela perda da função de genes supressores de tumor, responsáveis por controlar o ciclo celular, os mecanismos de reparo do material genético danificado e morte celular (CAMARDA, et al., 2017; HANAHAN, WEINBERG, 2000; WEINBERG, 2008).

Um marcador amplamente utilizado e bem estabelecido para avaliar progressão e agressividade tumoral é a proliferação celular, em melanomas observada principalmente a partir da expressão de Ki67 (WEINSTEIN et al., 2014). Já a apoptose, apesar de intimamente ligada com o processo carcinogênico e controle da população celular (LAO et al., 2006; LOWE, LIN, 2000), possui poucos estudos para confirmar sua ligação direta com o estadiamento nesse tipo tumoral (MODIANO, 1999). O que se sabe é que, em melanomas, índices apoptóticos se apresentam em números diminuídos, sendo inversamente proporcionais à agressividade da neoplasia (GLINSKY, 1997; STAUTON, GAFFNEY, 1995).

O melanoma tem grande importância devido a sua alta agressividade, elevado índice metastático e baixa resposta terapêutica, fazendo com que as modalidades tradicionais de tratamento para estágios mais avançados apresentem resultados insatisfatórios (CAINI et al., 2009; FERLAY et al., 2010).

Dessa forma, apesar da avaliação da divisão celular e das características histopatológicas bem definidas como marcadores prognósticos, ainda se torna necessário novas descobertas e parâmetros, que podem acrescentar ao conhecimento e desenvolvimento do tumor, e, mais ainda, que acrescentem na aplicação das terapias atualmente utilizadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) Melanoma

O melanoma é uma neoplasia caracterizada pela malignização dos melanócitos e é considerado entre os cânceres de pele o mais agressivo, com alta taxa de metastização e mortalidade, sendo que a sobrevida de 5 anos em pacientes com melanoma maligno metastático gira apenas em torno de 14% (FERLAY, 2010; MILLER 2006). É o décimo nono tipo de câncer mais comum no mundo, com mais de 230 mil novos casos diagnosticados em 2012. Tem maiores incidências em países de população predominantemente de pele clara, como os do norte da América e da Europa, bem como Austrália e Nova Zelândia (SITUM, et al., 2014). Apesar de uma incidência menor nos países da América do Sul, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a taxa de mortalidade no Brasil em 2013 foi de 1.547 mortes; para 2018, estima-se o aparecimento de 6.260 novos casos no país.

A pele é a principal barreira para o ambiente externo e depende dos melanócitos para fornecer, entre outras coisas, fotoproteção e termorregulação, através da melanina, sintetizada pelos melanócitos. Além da melanina existem os carotenóides e a hemoglobina, outros pigmentos de menor contribuição para essas funções e presentes em outros tipos celulares. (LIN, FISHER, 2007)

Os melanócitos possuem um citoplasma em formato de glóbulo de onde saem prolongamentos que seguem em direção à superfície da epiderme, têm como principal função a produção da melanina, sendo os principais responsáveis pela pigmentação da pele e do cabelo e que, assim, contribuem para as diferentes graduações de coloração nos indivíduos e proteção contra danos causados pela radiação ultravioleta, por sobreviverem a um considerável estresse genotóxico (LIN, FISHER, 2007). Os melanócitos humanos estão distribuídos principalmente na epiderme e nos folículos pilosos, mas estão presentes também na mucosa, olhos e cérebro, entre outros tecidos (YAMAGUCHI, HEARING, 2014).

Os grânulos contendo melanina são conhecidos como melanossomas e são exportados dos melanócitos para os queratinócitos adjacentes, onde a maioria dos pigmentos é encontrada. Como resultado, as diferenças de pigmentação podem surgir da variação no número, tamanho, composição e distribuição dos melanossomas, enquanto os números de melanócitos tendem a permanecer relativamente constantes em estados fisiológicos (LIN, FISHER, 2007).

Os melanócitos da pele são derivados da crista neural, o que influencia nas propriedades exclusivas desse tipo de célula. As células da crista neural são células pluripotentes que surgem do ponto mais distante do tubo neural entre o ectoderma superficial e a placa neural. (KAWAKAMI, FISHER, 2011 ; SOMMER, 2011). Após a indução da crista neural, as células-tronco sofrem transição epitéio-mesênquima (TEM) com perda de adesão a células vizinhas e, eventualmente, migração celular. Neste processo, os fatores de transcrição Snail/Slug reprimem a expressão da E-caderina e o subsequente descolamento e movimento celular (BANDARCHI, 2013). Além dos melanócitos, as células da crista neural dão origem a neurônios e células gliais, medula adrenal, células cardíacas e tecido craniofacial (LE DOUARIN, 2004). Os melanoblastos, precursores dos melanócitos, migram, proliferam e se

diferenciam rumo a seus eventuais destinos na epiderme basal e folículos pilosos, embora a distribuição precisa dos melanócitos varie entre as espécies (BANDARCHI, 2013; LIN, FISHER, 2007). Sugere-se que esses mecanismos, podem ser os responsáveis por conferir aos melanomas as características agressivas e o alto índice de metástases observado na maioria das vezes (MORT, JACKSON, PATTON, 2015; TSAO et al., 2012).

O acometimento do tumor se dá principalmente na epiderme, olhos e folículos capilares e tem um processo de tumorigênese diverso (SCHATTON et al., 2008) se estabelecendo a partir do momento em que os melanócitos, devido às alterações genéticas e epigenéticas, começam a se multiplicar de forma desordenada, formando ninhos celulares, iniciando um processo de angiogênese, até chegar na disseminação por vasos sanguíneos e linfáticos. Frequentemente, no caso de melanomas, a disseminação ocorre para outros sítios do organismo, caracterizando assim o processo de metástase. O alto poder metastático do melanoma caracteriza o principal fator de agressividade desse tumor (MILLER, 2006).

Existem vários fatores de risco, endógenos e exógenos, associados ao desenvolvimento de melanoma (WILLYARD, 2014). Entre os genéticos podem ser citados o quadro prévio de melanoma, histórico familiar da doença e nevos benignos e displásicos múltiplos (BANDARCHI, 2010). Já os fatores de risco de origem ambiental incluem: exposição prolongada e intermitente ao sol, tendência a bronzear-se facilmente e, exposição ultravioleta. A olho nu, os efeitos da radiação UV são marcados por "queimadura solar" e/ou "bronzeados", porém, mesmo em baixas doses de exposição o dano ao DNA pode ocorrer antes que haja qualquer evidência de mudança na pele (HEENEN, GIACOMONI, GOLSTEIN, 2001). Pessoas de pele clara, cabelos loiros ou ruivos, nevos congênitos e imunossupressão também podem apresentar maior susceptibilidade (KATSAMBAS, NICOLAIDOU, 1996; MERKLE, 1991; SCHNEIDER, MOORE, SAGEBIEL, 1994).

Histologicamente os melanomas são identificados por formações de populações de melanócitos, organizados em ninhos ou blocos, na derme e/ou epiderme, com células de citoplasma abundante, núcleos alongados ou ovalados e nucléolos evidentes apresentando padrão celular fusiforme e/ou epitelióide. (GOLDSCHMIDT et al., 1998). O grau de pigmentação também é variável entre os tumores, sendo que nem todos os melanomas se apresentam pigmentados (MCCLAINET al., 2012). Nesses casos, torna-se necessário o

diagnóstico diferencial a partir da expressão proteica de Melan-A e PNL-2 para confirmação do tipo neoplásico (MAZIÈRE ET AL., 2002; MORRIS ET AL., 2008).

As informações de tipo histológico do tumor, espessura do tumor, classificação de Clark - definidos de acordo com as camadas da pele acometidas pela lesão (CLARK ET AL., 1969), presença ou ausência de ulceração, regressão, índice mitótico, presença e quantidade de linfócitos infiltrantes tumorais, presença de invasão capilar e presença de invasão perineural são as exigidas num laudo histopatológico de um melanoma. Avaliação de possíveis metástases em linfonodos sentinelas e outros órgãos também tem importante contribuição para avaliação prognóstica do paciente (PAYETTE, 2009).

O American Joint Committee on Cancer (AJCC), em 2009, publicou os novos parâmetros utilizados para o estadiamento do melanoma segundo o sistema TNM, principal parâmetro clínico-patológico para avaliação prognóstica da doença. T determina que segundo o tamanho da neoplasia, com subdivisões incluindo a espessura do tumor e a taxa mitótica; o N inclui o número de linfonodos metastáticos, e sua carga tumoral; já a categoria M é definida por quaisquer metástases à distância e metástases viscerais (PAYETTE, 2009; SITUM, 2014).

O melanoma não é uma neoplasia exclusiva da espécie humana (DELLA PORTA et al., 1995; KUSEWITT, 1996; LEY, 2002; OVERWIJK, 2001; SIMPSON et al., 2013) por isso, além da importância no cenário médico veterinário, existem diversos modelos comparativos, *in vivo* e *in vitro*, que mimetizam o comportamento e a carcinogênese do melanoma humano e são importantes para correlacionar e entender o processo tumorigênico da doença (SIMPSON et al., 2013).

2.2) Melanoma canino

Em cães, o melanoma possui grande relevância clínica e representa cerca de 7% das neoplasias malignas que acometem esse animal, com relatos de até 100.000 diagnósticos por ano nos EUA (HILL, et al., 2000, GROSS, et al., 2005) e, assim como no humano atinge diferentes sítios anatômicos tais como a cavidade oral, pele, olhos e dígitos, sendo os dois primeiros com maior incidência (GOLDSCHMIDT, HENDRICK, 2002; OMHOLT, 2011). É considerada a neoplasia que mais acomete a cavidade oral da espécie canina (BERGMAN, 2007), sendo

correlacionados com maior agressividade e pior prognóstico quando comparado a melanomas dados em outros locais (GROSS et al., 2005). Num contexto geral possui sobrevida reduzida, devido principalmente a um diagnóstico tardio, dificuldade de resposta aos tratamentos convencionais e alto poder metastático, assim como nos humanos (GROSS et al., 2005).

O melanoma canino não apresenta predisposição relacionada ao sexo, e tendem 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).

Diferentes autores demonstram o uso do modelo canino no estudo do melanoma (GOLDSCHMIDT, HENDRICK, 2002; SIMPSON, 2013). Tal fato se justifica devido ao fato do cão apresentar características moleculares, histopatológicas e clínicas similares às observadas em humanos (SIMPSON, 2013).

A iniciação e desenvolvimento do melanoma canino se assemelham em muitos aspectos com o humano (MODIANO, 1999). Alguns aspectos moleculares já foram estudados com um caráter comparativo em relação à neoplasia em humanos, levando-se em consideração análises genéticas para *CDK4*, *NRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *GNAQ* e *KIT*, porém, investigações mais aprofundadas são necessárias para a melhor compreensão sobre o desenvolvimento do melanoma nessa espécie (NISHIYA et al., 2016).

2.3) Marcadores oncogênicos em melanomas

Assim como outras neoplasias, o melanoma possui processo carcinogênico complexo, que envolve várias vias, estruturas e moléculas (BANDARCHI, 2013). Possui também uma infinidade de marcadores, prognósticos e preditivos, para avaliar e acompanhar o desenvolvimento tumoral.

Quando as células sofrem danos no seu código genético, precisam de outros fatores para continuar sua progressão. Nas células melanocíticas, por exemplo, uma proliferação desenfreada pode ser desencadeada por uma ativação indevida da proteína quinase ativadora de mitose, que por consequência pode resultar em mutações do tipo *NRAS* e *BRAF* – mutações presentes em 15 e 50 %, respectivamente, nos diagnósticos de melanoma (MILLER, 2006;

EKEDAHN et al., 2013). Contudo, estudos mais aprofundados, correlacionando com outros marcadores prognósticos associados, local de ocorrência, relação com sobrevida precisam ser explorados em maior profundidade.

Um marcador amplamente utilizado para avaliar progressão e agressividade tumoral em melanoma é o Ki67, uma proteína expressa em todo o ciclo celular, exceto em G0 e com uma marcação imuno-histoquímica confiável para avaliação da proliferação celular, mais até que a contagem de mitoses (WEINSTEIN et al., 2014). O Ki67 é considerado um marcador extremamente sensível e útil na avaliação prognóstica e monitoramento do tratamento da doença, bem como para avaliar o risco do desenvolvimento de metástases do melanoma (BROWN; GATTER, 2002).

Além do índice de proliferação celular, outros critérios histopatológicos devem ser considerados na análise de melanomas. O melanoma pode apresentar duas principais variações de morfologia celular: células fusiformes e epitelióides. Aparentemente, tipos histológicos epitelióide apresentam maior alteração na cromatina, o que está relacionado a uma maior agressividade em neoplasias pigmentadas (CHI et al., 1993). Por vezes, tumores com predominância de células fusiformes tendem a apresentar tecido desmoplásico entre seus componentes histológicos (WEISSINGER et al., 2014). A desmoplasia, considerada na medicina humana como um subtipo de melanoma e não somente um achado histológico, trata-se da deposição de tecido conjuntivo fibroso em meio ao estroma tumoral. Ainda não se sabe se o aspecto possível desmoplásico dessa neoplasia confere um pior ou melhor prognóstico ao paciente (MACEDO PASCHOAL et al., 2012). A presença de atividade juncional é descrita no melanoma humano como um subtipo chamado de melanoma lentiginoso. Esse tipo de atividade consiste na migração de melanócitos da camada basal da epiderme para a porção mais externa dessa mesma camada. Muitas vezes, o acúmulo de vários melanócitos fora da camada basal da epiderme é descrito como “melanoma *in situ*”. Por vezes, essa migração pode ocorrer também em lesões melanocíticas benignas, como em nevus lentiginosos (KING, 2011). Os tumores pigmentados tendem a apresentar um comportamento diverso aos 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., 2015).

A apoptose ainda não é considerada como um biomarcador bem descrito para o melanoma, porém há uma intensa busca por fatores de morte celular alterados durante a progressão do tumor, já que ela é considerada como um mecanismo chave para controle da carcinogênese (LAO et al., 2006; LOWE, LIN, 2000) e sabe-se que defeitos em múltiplos níveis nas principais vias apoptóticas foram descritos no melanoma (GROSSMAN, ALTIERI, 2001). Tem sido observado que os índices apoptóticos se apresentam em níveis baixos nos melanomas, sendo mais evidente esse fato em estágios avançados e tumores mais agressivos (GLINSKY, 1999; STAUNTON, GAFFNEY, 1995). Falhas importantes do controle da morte celular podem estar associadas a três tipos de alterações moleculares: ativação de fatores antiapoptóticos, inativação de efetores pró-apoptóticos e reforço de sinais de sobrevivência (SOENGAS, 1999).

Além disso, existe uma parte importante nas abordagens terapêuticas que são destinadas a melhorar a ação de drogas antitumorais convencionais usando ou se associando às vias apoptóticas (REED, 2000; REED 2001)

2.4) Apoptose

O processo apoptótico, conhecido como uma forma de “suicídio celular” representa uma morte celular programada, caracterizada por critérios morfológicos e bioquímicos e pode ser considerada como uma contrapartida da mitose (ELMORE, 2007; SOENGAS, LOWE, 2003).

O código genético consiste em genes definidos que previnem ou promovem a apoptose. Esses genes, por sua vez, controlam os passos bioquímicos que compõem o processo da morte celular programada. As alterações bioquímicas levam, finalmente, aos critérios morfológicos que definem a apoptose, incluindo a perda da assimetria de membrana, ruptura da função mitocondrial, formação de bolhas citoplasmáticas, condensação e marginação da cromatina, formação de corpos apoptóticos e fagocitose por macrófagos e células normais. Diferente da necrose, a inflamação e a destruição da arquitetura tecidual não são características associadas à apoptose (MODIANO, 1999; SOENGAS, LOWE, 2003).

A apoptose é extensivamente estudada e indica que o destino de uma célula depende de uma rede complexa de sensores e de reguladores positivos e negativos cujo balanço determinará se a célula sofrerá a apoptose (SOENGAS, LOWE, 2003).

Os mecanismos são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Existem duas vias apoptóticas principais: a via extrínseca está ligada a eventos que envolvem "receptores de morte ligados à membrana" e a via intrínseca ou mitocondrial, associada principalmente às funções dessa organela. Há também evidências de que as duas vias estão ligadas e que as moléculas em uma via podem influenciar a outra. Existe ainda uma via adicional que envolve a citotoxicidade mediada por células T e morte celular dependente de granzima-perforina. A via intrínseca, mais ligada aos processos carcinogênicos é regulada tanto positiva, quanto negativamente. Sinais negativos envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas que podem levar à falha na supressão dos programas de morte, desencadeando, assim, a apoptose. Já quando ocorre positivamente, é desencadeada principalmente por radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (ELMORE, 2007; SOENGAS, LOWE, 2003).

Todos esses estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna que resulta em uma abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), perda do potencial transmembrana mitocondrial e liberação de dois grupos principais de proteínas pró-apoptóticas, normalmente seqüestradas do espaço intermembranar, para o citosol (ELMORE, 2007, SAELENS, 2004).

O controle e a regulação desses eventos mitocondriais apoptóticos ocorrem através de membros da família de proteínas Bcl-2, que rege a permeabilidade da membrana mitocondrial e podem ser pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos. Até o momento, um total de 25 genes foram identificados na família Bcl-2. Algumas das proteínas anti-apoptóticas incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, e algumas das proteínas pró-apoptóticas incluem Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk. Acredita-se que o principal mecanismo de ação da família de proteínas Bcl-2 seja a regulação da liberação de citocromo c da mitocôndria via alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (CORY, ADAMS, 2002).

Todo esse decurso tem grande interferência de uma família de proteases, as caspases. As caspases incluem caspases iniciadoras – 8 e 9, que clivam pró-formas inativas das caspases efetoras – 3, 6 e 7, principalmente, ativando-as. Uma vez ativadas, essas proteases clivam enzimas e proteínas essenciais para a viabilidade da célula (ELMORE, 2007).

A liberação do citocromo *c* é seguida pela formação de um complexo citoplasmático de massa molecular alta, denominado apoptossomo. Essa formação é início da via intrínseca: formação de apoptossomo mediada por mitocôndrias, seguida de ativação de caspases-9, responsável pela clivagem da caspase-3. A caspase-3, considerada efetora e presente nas vias intrínseca e extrínseca, desempenha um fundamental papel de execução no passo final do processo apoptótico, produzindo, principalmente, a fragmentação do DNA (ELMORE, 2007; SOENGAS, LOWE, 2003).

Mesmo com uma descrição importante na literatura sobre apoptose e carcinogênese ainda se torna necessário estudos mais aprofundados sobre como essas vias se correlacionam, principalmente nos melanomas, para terem uma aplicabilidade mais efetiva no acompanhamento da tumorigênese e das terapias utilizadas.

Diante de estudos prévios sugere-se que, em melanomas, uma maior agressividade está relacionada a uma maior proliferação celular e a uma evasão da apoptose, conseqüentemente com menor expressão de marcadores pró-apoptóticos e aumento de marcadores anti-apoptóticos. Nesse sentido, os resultados do trabalho podem auxiliar na compreensão da oncogênese no modelo espontâneo canino, sugerindo relevantes informações preditivas e prognósticas no cenário veterinário, bem como fornecer informações comparativas relevantes para o estudo desses tumores em seres humanos.

3. OBJETIVOS

3.1) Objetivo geral

Caracterizar a expressão de marcadores da cascata apoptótica - Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-3 clivada e Caspase-9, e sua relação com a proliferação celular, determinada pela expressão de

Ki67, bem como com as características histopatológicas em melanomas caninos orais e cutâneos.

3.2) Objetivos específicos

- Classificar e caracterizar, de acordo com os critérios histopatológicos empregados em diagnóstico canino, melanomas caninos cutâneo e oral.
- Quantificar a expressão imuno-histoquímica de Ki-67, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada em células neoplásicas de melanomas caninos cutâneo e oral.
- Correlacionar as características histopatológicas e a expressão dos marcadores Ki-67, Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada em células neoplásicas de melanomas caninos cutâneo e oral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 008/2016).

4.2) Casos

Foram analisados 40 casos de melanomas cutâneos e orais, mantidos em blocos de parafina, recuperados do arquivo do Laboratório do Comportamento Celular e do Laboratório de Patologia Comparada, ambos do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, recebidos entre 2005 e 2016, obtidos de excisão cirúrgica de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM).

4.3) Avaliação Histopatológica

Cortes de 4µm de tecidos fixados em formol neutro e tamponado a 10%, mantidos em parafina foram corados com a técnica hematoxilina-eosina (HE). Cada amostra foi reexaminada para confirmação do diagnóstico morfológico de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (GOLDSCHMIDT, 1998).

As seguintes características foram determinadas na avaliação histopatológica: a morfologia das células neoplásicas (fusiformes ou epitelióides), grau de pigmentação das lesões (0: ausência de pigmentação; 1: 1-25% de células tumorais pigmentadas; 2: 26-50% de células tumorais pigmentadas e 3: >51% de células tumorais pigmentadas), índice mitótico, evidência de invasão vascular (êmbolo neoplásico), ulceração, desmoplasia e presença de atividade juncional (lentiginosa ou pagetóide). O cálculo de índice mitótico foi realizado a partir da média do número de mitoses em 10 campos de maior aumento.

4.4) Imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica, foram realizados cortes de 4µm, que foram fixados em lâminas gelatinizadas. Foi realizada a técnica para a avaliação de Melan-A, (utilizado para a confirmação diagnóstica de melanoma em tumores amelanóticos e pigmentados), Ki-67, (avaliação do índice proliferativo), Caspase-3, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2 (proteínas envolvidas na cascata de apoptose) (Tabela 1). O experimento foi realizado através do método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. Primeiramente, todas as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização, através de banhos de 15 minutos em dois recipientes contendo Xilol, e reidratação, através de banhos de 3 minutos em álcoois com diluições decrescentes (100%, 100%, 90% e 80%) e 10 banhos sucessivos em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada através de calor úmido (banho-maria a 98°C) por 20 minutos ou de calor pressurizado a uma temperatura de 125⁰C por 40 minutos (Pascal®), com solução de citratopH 6,0 (DakoCytomation Target RetrievalSolution) ou EDTA pH 9,0 (DakoCytomation Target RetrievalSolution) diluído a uma concentração de 10%, e posteriormente resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 10% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum – Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA) (Melan-A, Ki67, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2)

ou solução de leite em pó integral (Molico, Nestlé®) 8% (Caspase-3). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo que as lâminas para Melan-A, Ki-67, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2 foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, por um período de 16 horas (*overnight*), a 4^oC; já as lâminas para Caspase-3 tiveram incubação por 1 hora em temperatura ambiente. A amplificação da reação foi realizada através do sistema comercial Novolink (Novolink Polymer Detection System; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) ou HRP (*Advance™ HRP*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A reação entre antígenos e anticorpos foi visualizada através da revelação com o cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 3 minutos. Após a lavagem do cromógeno, as lâminas para Melan-A, Ki67, Caspase-3, Bax e Bcl-2 foram contra corados por Giemsa, diluído a 20%, por um período de 30 minutos. As lâminas para Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada passaram por esse mesmo processo, porém com um banho rápido em hematoxilina, seguido de lavagem em água corrente por 5 minutos antes da aplicação do Giemsa. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a um processo de diferenciação em ácido acético glacial a 1%, desidratadas em álcool absoluto e álcool isopropílico e montadas com Entellan® (Merck). Para a obtenção dos controles negativos, os respectivos anticorpos primários foram substituídos por tampão fosfato-salino (PBS). Como controle positivo interno para Melan-A e Ki-67 foi-se observado a marcação positiva em melanócitos e de células epiteliais da camada basal da epiderme, respectivamente. Para os outros anticorpos foram utilizados fragmentos histológicos de timo murino em involução como controle positivo.

Tabela 1. Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário segundo padronização prévia do grupo de pesquisa.

<i>Anticorpo</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Anticorpo secundário</i>
Ki67	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<i>Anticorpo</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Anticorpo secundário</i>

Melan-A	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
Bax	Abcam	Ab7977	1:50	16h	EDTA + calor úmido pressurizado	HRP
Bcl-2	Dako	124	1:50	16h	EDTA + calor úmido pressurizado	HRP
Caspase-3	NeoMarkers	CPP32	1:100	1h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
Caspase-3 clivada	CellSignaling	Asp175	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	HRP
Caspase-9 clivada	CellSignaling	D353	1:100	16h	Citrato + calor úmido	Novolink

4.5) Avaliação da imuno-histoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 40x (Olympus – BX41).

A positividade para Melan-A foi identificada pela presença de marcação citoplasmática de cor amarronzada distinta e foi avaliada por um método semiquantitativo previamente descrito; foram considerados positivos os casos que apresentaram a marcação citoplasmática em mais que 10% das células neoplásicas (SMEDLEY et al., 2011).

Para a determinação do índice proliferativo das lesões, através da imuno-histoquímica para Ki-67, considerou-se positividade as células que possuíam núcleo imunomarcado. Para contagem foi realizada a identificação de áreas *hot spots* no tumor, onde foram contadas um total de 500 células tumorais por lâmina, em objetiva de 40x (Olympus – BX41). Dentro do total de células contadas, fez-se o cálculo de porcentagem do número de células que apresentavam marcação, obtendo-se assim, o índice requerido.

A análise Caspase-3, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2, proteínas presentes na cascata de apoptose, também foi feita considerando o percentual de células neoplásicas com

marcação amarronzada no citoplasma e no núcleo a partir da contagem de 500 células, em objetiva de 40x (Olympus – BX41).

4.6) Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizada o *software InStat (GraphPad Software)*, versão 3.0. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. 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, sendo considerada correlação elevada se $R \geq 0,6$ (DANCEY, REIDY, 2005). Para os resultados quantitativos realizou-se ainda a comparação de médias pelo teste t ou Mann-Whitney. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de artigo científicos que se encontra nas normas do periódico a que será submetido.

Artigo: A expressão de proteínas da via intrínseca da apoptose estão relacionadas a uma maior proliferação em melanomas caninos

Este trabalho será submetido ao *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, que possui Qualis CAPES B1 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 2.816.

A expressão de proteínas indutoras da apoptose está relacionada a uma maior proliferação em melanomas caninos

Bárbara A. Carvalho, Emerson S. Veloso, Bruna M. Lima, Renato F. Costa, Camila P. Almeida, Geovanni D. Cassali, Helen L. Del Puerto, Enio Ferreira.

(BAC, ESV, BML, RFC, CPA, GDC, HLDP, EF) Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

Autor Correspondente:

Enio Ferreira

Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6.627, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG. 31270-901, Brasil. Tel/Fax.: +55 31 34093039.

E-mail: enioferreira@ufmg.br

RESUMO

O melanoma é reconhecidamente uma neoplasia extremamente agressiva, por possuir alta taxa de mortalidade, tanto em humanos quanto animais. Sabe-se que um importante parâmetro de agressividade tumoral é o índice proliferativo e apoptótico, onde tumores mais agressivos apresentam maiores taxas de proliferação celular e baixas taxas de apoptose. Entretanto, ativação da apoptose ainda é pouco compreendido em melanomas. Apesar de serem identificados menores índices apoptóticos em melanomas em estágio avançado, a expressão de proteínas envolvidas nesse processo não necessariamente está condicionada a uma maior agressividade nesse tipo tumoral. Assim, esse trabalho tem como objetivo correlacionar a expressão imuno-histoquímica de algumas proteínas envolvidas na ativação intrínseca da apoptose (Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada) com o comportamento proliferativo, por meio da expressão de Ki67, em melanomas caninos cutâneos e orais. Foram selecionados 40 casos de melanomas caninos cutâneos e orais, arquivados em blocos de parafina, para avaliação histopatológica (presença de êmbolo, desmoplasia, atividade juncional, índice mitótico, ulceração) e realização da técnica de imunohistoquímica. Foram observadas correlações positivas entre um maior índice proliferativo e a maior expressão de Bax, entre as expressões de Bcl-2, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada, e as expressões de Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada. Ademais, observou-se associação significativa entre baixas expressões de Ki67 e Caspase-3 clivada, além de um menor índice médio de expressão de Caspase-9 clivada em melanomas orais, quando comparados a lesões cutâneas. Não foi encontrada nenhuma associação entre o índice mitótico, as características histopatológicas e os grupos de alta e baixa expressão dos marcadores imuno-histoquímicos estudados. Assim, nossos resultados demonstram que, a maior expressão de marcadores de proliferação e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 está associado a uma maior expressão das proteínas pró-apoptóticas, Caspase 3, 9 e Bax. Tais achados indicam que mecanismos de morte celular programada podem ainda estar associados ao controle da proliferação celular nos melanomas caninos.

PALAVRAS-CHAVES: melanoma, imunohistoquímica, cão, apoptose, proliferação celular.

INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia caracterizada pela malignização dos melanócitos e é considerado entre os cânceres de pele o mais agressivo, com alta taxa de metastização e mortalidade (1, 2). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a taxa de mortalidade no Brasil em 2013 foi de 1.547 mortes; para 2018, estima-se o aparecimento de 6.260 novos casos no país (3). O acometimento do tumor se dá principalmente na epiderme, olhos e folículos capilares e tem um processo de tumorigênese diverso, podendo ser tanto genético, como apresentar fatores epigenéticos (4).

O melanoma em cães também tem grande relevância clínica e representa cerca de 7% das neoplasias malignas que acometem esse animal, com relatos de até 100.000 diagnósticos por ano nos EUA (5, 6, 7) e, assim como no humano atinge diferentes sítios anatômicos tais como a cavidade oral, pele, olhos e dígitos (7, 8, 9).

Existem diversos modelos animais para estudo de melanoma, sendo frequentemente citado o modelo canino (7, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Dentre as justificativas desse modelo baseia-se no cão apresentar características moleculares, histopatológicas e clínicas similares às observadas em humanos, por estas semelhanças são propostos como modelos comparativos oncológicos pré-clínicos (11).

O melanoma, devido a sua alta agressividade, elevado índice metastático e baixa resposta terapêutica, pode resultar com que as modalidades tradicionais de tratamento apresentem resultados insatisfatórios, principalmente para estágios mais avançados (2, 16). Por isso, existe uma parte importante nas abordagens terapêuticas que são destinadas a melhorar a ação de drogas antitumorais convencionais usando ou se associando às vias apoptóticas (17, 18).

Estudos revelam que a apoptose pode ser considerada como um mecanismo chave para controle da carcinogênese (19, 20). A apoptose é definida como um fenômeno de morte celular programada, caracterizada por critérios morfológicos e bioquímico, que se contrapõe ao processo de divisão celular. Todo esse decurso tem grande interferência de estrutura e moléculas, dependentes uns dos outros e também de gasto energético (21, 22). Os membros da família de proteínas Bcl-2 são essenciais logo no início do processo; eles regem a

permeabilidade da membrana mitocondrial e podem ser pró-apoptóticos ou anti-apoptóticos, dependendo da subfamília e da proteína expressa. Algumas das proteínas anti-apoptóticas incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG, e algumas das proteínas pró-apoptóticas incluem Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk (23). Há também as caspases: proteínas pertencentes à família das proteases onde as caspases iniciadoras – 8 e 9, clivam pró-formas inativas das caspases efetoras – 3, 6 e 7 principalmente, ativando-as. Uma vez ativadas, essas proteases clivam enzimas e proteínas essenciais para a viabilidade da célula (21, 24, 25).

Estudos mostram que os índices apoptóticos se apresentam em níveis baixos nos melanomas, sendo mais evidente esse fato em estágios avançados e tumores mais agressivos (26, 27), contudo a expressão de proteínas presentes nesse processo ainda é pouco esclarecedora. Assim, esse trabalho tem por objetivo caracterizar a expressão de proteínas envolvidas na cascata de apoptose e sua relação com a proliferação celular, determinada pela expressão de Ki67, bem como com as características histopatológicas observadas em melanomas caninos cutâneos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 008/2016).

Casos

Foram analisados 40 casos de melanomas cutâneos e orais, mantidos em blocos de parafina, recuperados do arquivo do Laboratório do Comportamento Celular e do Laboratório de Patologia Comparada, ambos do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os materiais foram recebidos entre 2005 e 2016, obtidos de excisão cirúrgica de cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM).

Avaliação Histopatológica

Cortes de 4µm de tecidos fixados em formol neutro e tamponado a 10%, mantidos em parafina foram corados com a técnica hematoxilina-eosina (HE). Cada amostra foi reexaminada para confirmação do diagnóstico morfológico de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (28).

As seguintes características foram determinadas na avaliação histopatológica: a morfologia das células neoplásicas (fusiformes ou epitelióides), grau de pigmentação das lesões (0: ausência de pigmentação; 1: 1-25% de células tumorais pigmentadas; 2: 26-50% de células tumorais pigmentadas e 3: >51% de células tumorais pigmentadas), índice mitótico, evidência de invasão vascular (êmbolo neoplásico), ulceração, desmoplasia e presença de atividade juncional (lentiginosa ou pagetóide). O cálculo de índice mitótico foi realizado a partir da média do número de mitoses em 10 campos, em objetividade 40x (Olympus – BX41).

Imuno-histoquímica

Para a imunohistoquímica, foram realizados cortes de 4µm, que foram fixados em lâminas gelatinizadas. Foi realizada a técnica para a avaliação de Melan-A, (utilizado para a confirmação diagnóstica de melanoma em tumores amelanóticos e pigmentados), Ki-67, (avaliação do índice proliferativo), Caspase-3, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2 (proteínas envolvidas na cascata de apoptose) (Tabela 1). O experimento foi realizado através do método do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. Primeiramente, todas as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização, através de banhos de 15 minutos em dois recipientes contendo Xilol, e reidratação, através de banhos de 3 minutos em álcoois com diluições decrescentes (100%, 100%, 90% e 80%) e 10 banhos sucessivos em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada através de calor úmido (banho-maria a 98°C) por 20 minutos ou de calor pressurizado a uma temperatura de 125⁰C por 40 minutos (Pascal®), com solução de citratopH 6,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) ou EDTA pH 9,0 (DakoCytomation Target Retrieval Solution) diluído a uma concentração de 10%, e posteriormente resfriado em temperatura ambiente por 20 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 10% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum – Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real

Carpinteria, CA, USA) (Melan-A, Ki67, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2) ou solução de leite em pó integral (Molico, Nestlé®) 8% (Caspase-3). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo que as lâminas para Melan-A, Ki-67, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2 foram incubadas com os respectivos anticorpos primários, por um período de 16 horas (*overnight*), a 4^oC; já as lâminas para Caspase-3 tiveram incubação por 1h em temperatura ambiente. A amplificação da reação foi realizada através do sistema comercial Novolink (Novolink Polymer Detection System; LeicaBiosistemas, Newcastle upon Tyne, UK) ou HRP (*Advance™ HRP*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A reação entre antígenos e anticorpos foi visualizada através da revelação com o cromógeno 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) (Dako) por 3 minutos. Após a lavagem do cromógeno, as lâminas para Melan-A, Ki67, Caspase-3, Bax e Bcl-2 foram contra corados por Giemsa, diluído a 20%, por um período de 30 minutos. As lâminas para Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada passaram por esse mesmo processo, porém com um banho rápido em hematoxilina, seguido de lavagem em água corrente por 5 minutos antes da aplicação do Giemsa. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a um processo de diferenciação em ácido acético glacial a 1%, desidratadas em álcool absoluto e álcool isopropílico e montadas com Entellan® (Merck). Para a obtenção dos controles negativos, os respectivos anticorpos primários foram substituídos por tampão fosfato-salino (PBS). Como controle positivo interno para Melan-A e Ki-67 foi-se observado a marcação positiva em melanócitos e de células epiteliais da camada basal da epiderme, respectivamente. Para os outros anticorpos foram utilizados fragmentos histológicos de timo murino em involução como controle positivo.

Avaliação da imuno-histoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 40x (Olympus – BX41).

A positividade para Melan-A foi identificada pela presença de marcação citoplasmática de cor amarronzada distinta e foi avaliada por um método semiquantitativo previamente descrito; foram considerados positivos os casos que apresentaram a marcação citoplasmática em mais que 10% das células neoplásicas (29).

Para a determinação do índice proliferativo das lesões, através da imunohistoquímica para Ki-67, considerou-se positividade as células que possuíam núcleo imunomarcado. Para contagem foi realizada a identificação de áreas *hot spots* no tumor, onde foram contadas um total de 500 células tumorais por lâmina, em objetiva de 40x (Olympus – BX41). Dentro do total de células contadas, fez-se o cálculo de porcentagem do número de células que apresentavam marcação, obtendo-se assim, o índice requerido.

A análise Caspase-3, Caspase-3 clivada, Caspase-9 clivada, Bax e Bcl-2, proteínas presentes na cascata de apoptose, também foi feita considerando o percentual de células neoplásicas com marcação amarronzada, citoplasmática e nuclear, a partir da contagem de 500 células em objetividade 40x (Olympus – BX41).

Análise estatística

Para a análise estatística, foi utilizada o *software InStat (GraphPad Software)*, versão 3.0. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. 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. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Confirmação diagnóstica

Todos os casos incluídos neste trabalho tiveram seu diagnóstico confirmado por um patologista veterinário (E.F.). Para confirmação diagnóstica, todas as amostras foram confirmadas como melanomas a partir da coloração imuno-histoquímica positiva para Melan-A no citoplasma de pelo menos 10% das células neoplásicas (Figura 1).

Parâmetros histológicos

Foram determinadas as seguintes ocorrências das características histológicas presentes nas amostras tumorais: pigmentação, morfologia das células neoplásicas (fusiforme ou epitelióide), presença de atividade juncional (tipos lentiginoso e pagetoide), desmoplasia e invasão vascular tumoral, tanto em amostras cutâneas quanto orais (Tabela 2).

Foi observado um índice mitótico médio de $4,08 \pm 2,77$ nas amostras analisadas. Contudo, não foram identificadas diferenças significantes entre com os parâmetros histológicos analisados.

Expressão imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para Ki67 foi determinada quando presente estritamente no núcleo das células neoplásicas; a marcação de Caspase-3, Bcl-2, Bax, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada foi considerada quando observada a imunomarcação citoplasmática e nuclear em células neoplásicas. A marcação de caspase foi considerada somente quando associada a fenômenos citológicos compatíveis com apoptose.

Dentre os casos estudados, foram desconsiderados os casos onde a reação imuno-histoquímica não apresentou uma boa qualidade na marcação e/ou os marcadores não reagiram de acordo com os parâmetros pré-determinados. Assim, foram estudadas as expressões de Ki67, Caspase-3, Bcl-2, Bax, Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada foram consideradas em 100% (40/40), 87,5% (35/40), 80% (32/40), 75% (30/40), 85% (34/40) e 77,5% (31/40) das amostras respectivamente.

Na obtenção do índice de marcação para Ki-67 foi observada uma média de células marcadas de $28,60\% \pm 18,10\%$ e uma mediana de 23,74% (Figura 2A e 2B). Para Bcl-2 o índice de marcação apresentou uma média de $5,22\% \pm 4,01\%$ e uma mediana de 4,50% de células marcadas (Figura 2C e 2D). O índice de marcação para Bax apresentou uma média de $9,76\% \pm 5,95\%$ e uma mediana de 8,50% de células marcadas (Figura 2E e 2F). No índice de marcação para Caspase-3, foi visto uma média de $11,78\% \pm 4,69\%$ e uma mediana de 11,80% de células marcadas (Figura 3A e 3B). No índice de marcação para Caspase-3 clivada, foi visto uma média de $3,57\% \pm 2,84\%$ e uma mediana de 2,90% de células marcadas (Figura 3C e 3D). No índice de marcação para Caspase-9 clivada, foi visto uma média de $2,75\% \pm 2,74\%$ e uma

mediana de 1,20% de células marcadas (Figura 3E e 3F). Os grupos foram divididos como baixa e alta expressão a partir da mediana de cada marcador.

Quando associados com os grupos de alta e baixa expressão dos marcadores imunohistoquímicos estudados, divididos a partir da mediana das amostras de cada grupo, não foi encontrada nenhuma associação entre as características histológicas e o índice mitótico das amostras analisadas.

Relação entre os marcadores de proliferação celular e de apoptose

Na análise de correlação entre a expressão dos marcadores analisados, foi observada uma relação positiva entre a expressão de Bax e Ki67 ($r = 0,3852$; $p = 0,0335$) (Figura 4), e uma relação positiva entre a expressão Bcl-2 com a Caspase-3 clivada ($r = 0,6113$; $p = 0,0009$) (Figura 5), e com a Caspase-9 clivada ($r = 0,5736$; $p = 0,0034$) (Figura 6). Além disso, foi identificada também que a elevação da expressão de Caspase-3 clivada esteve relacionada ao aumento da expressão de Caspase-9 clivada ($r = 0,6352$; $p = 0,0004$) (Figura 7).

Quando divididos os casos em alto e baixo índice proliferativo, a partir da mediana calculada da contagem de Ki67, foram obtidos 20 casos de baixa proliferação (média de $14,87\% \pm 5,70\%$) e 20 casos de alta proliferação (média de $42,33\% \pm 16,03\%$). Foi possível observar uma associação significativa entre a ocorrência de baixa expressão de Ki67 e baixa expressão de Caspase-3 clivada ($P = 0,0454$), onde 35% dos casos apresentavam baixa expressão de Ki67 e baixa expressão de Caspase-3 clivada. Contudo, não foi observada diferença significativa na análise de média de expressão entre dos marcadores para apoptose, quando divididos a partir dos grupos de baixa e alta proliferação.

Quando os casos foram divididos em melanomas orais e cutâneos, para análise da média de expressão dos marcadores (Tabela 3), somente a Caspase-9 clivada apresentou diferença estatística de expressão ($P = 0,0347$); sendo que o grupo oral apresentou uma média de $1,44\% \pm 1,15\%$ e o grupo cutâneo uma média de $3,49\% \pm 3,24\%$ de células marcadas (Figura 9).

DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos uma relação positiva significantes entre o índice proliferativo e a expressão da proteína pro-apoptótica Bax, e entre a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e a Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada. Demonstrando uma aparente relação entre os mecanismos que promovem uma maior proliferação celular e a indução da apoptose em melanomas caninos. Tais resultados são extensivamente discutidos, a partir da teoria que genes supressores de tumor e protooncogenes são alguns dos grandes responsáveis por esse equilíbrio, principalmente nas neoplasias (30, 31, 32).

A carcinogênese se apresenta como um processo complexo e variável, com uma infinidade de causas e onde todo esse desenvolvimento representa um conjunto de etapas que ocorrem progressivamente, como observado quando encontramos uma relação entre os marcadores pró e anti-apoptóticos nos melanomas estudados. Durante esse ciclo, as células potencialmente cancerosas acumulam defeitos genéticos que a fazem ter uma vantagem proliferativa em relação às demais, mas ao mesmo tempo vão de frente a um programa celular que visa eliminar essas células danificadas. Assim, é essencial que as células cancerígenas adquiram instrumentos para contornar a morte celular programada (33).

A apoptose pode ser considerada um mecanismo que atua no controle da proliferação celular, pois é o principal tipo de morte da célula que ocorre quando o dano ao DNA é irreparável (34). Através da identificação de moléculas envolvidas na regulação e execução do processo apoptótico e sua conseqüente influência no desenvolvimento do melanoma, pode-se fomentar novas estratégias terapêuticas casos os tumores sejam elegíveis – bem descritos por desenvolver tal mecanismo (21). Nossas evidências sugerem que o aumento da expressão de alguns fatores regulatórios importantes, envolvidos nessa cascata, podem levar ao aparecimento da neoplasia e ao mesmo tempo promover mecanismo de indução morte das células neoplásicas.

Melanomas com prognósticos piores e que se apresentam em estágios avançados tendem a ter índices apoptóticos reduzidos (26, 27). Nesses mesmos estudos foram mostrados que uma perda significativa do controle da morte celular pode estar associada a três tipos de alterações moleculares: ativação de fatores anti-apoptóticos, inativação de efetores pró-apoptóticos e reforço de sinais de sobrevivência correlacionando assim a relevante possibilidade de um favorecimento da apoptose como alvo terapêutico em um número significativo de trabalhos (35, 36, 37, 38). Contudo, nossos dados demonstram que, em melanomas caninos, alguns desses

eventos pró-apoptóticos estão preservados e provavelmente esses tumores podem ser alvos significantes para essas propostas terapêuticas.

Dentre os mecanismos de ativação da apoptose, a disfunção mitocondrial é o passo inicial na via apoptótica intrínseca (21), onde se observa, nos melanomas, uma variedade de desregulação das moléculas presentes nessa via. Os membros da família de proteínas Bcl-2 controlam e a regulam os eventos mitocondriais apoptóticos. Nossos dados demonstram que a maior presença dessa proteína está relacionada a presença de caspases efetoras da apoptose. Possivelmente, a correlação entre a expressão dessas proteínas podem estar relacionadas a uma tentativa de balanceamento entre a morte e sobrevivência celular, visto que proteínas anti-apoptóticas ligam-se à BAX, que é pró-apoptótica, impedindo sua ativação. O balanço das interações entre os diferentes membros da família BCL-2 determina se as células iniciarão a apoptose (39, 40).

Linhagens celulares de melanomas humanos, após sofrerem alterações moleculares ou químicas, apresentaram um maior índice apoptótico. Nesses estudos, uma maior ocorrência de apoptose era acompanhado e comprovado por uma elevação significativa de Bax e por infra-regulação de Bcl-2 (41, 42), bem como um aumento da expressão das caspases, principalmente da caspases-3 e da caspase-9 (38, 41, 42). Linhagens celulares de melanomas murinos, quando passadas por estimulação molecular ou química, apresentaram uma elevação significativa de caspases-3 e caspase-8 (37, 42).

De acordo com a literatura esperava-se uma relação proporcional de índices apoptóticos com marcadores indicativos de maior agressividade tumoral (maior proliferação, presença de êmbolos neoplásicos, maior índice mitótico). Os dados indicaram uma correlação positiva entre a expressão de Ki67 e de Bax, que fomentam a ideia de quanto mais proliferativo, e consequentemente mais agressivo o tumor, maior a expressão de proteínas pro-apoptóticas, na tentativa de limitar a população celular. Tal fato tem sido hipotetizado, após a observação de que a indução da apoptose, *in vitro*, promovem uma variação da relação Bax / Bcl-2, aumentando a expressão de Bax (38).

Nas correlações entre os próprios índices apoptóticos, a correlação entre um aumento da expressão de Bcl-2, sabidamente anti-apoptótico, com a caspase-3 clivada e caspase-9 clivada

pode indicar um acúmulo de expressão protéica de Bcl-2 geneticamente modificada, já que o clone utilizado não é específico para proteínas funcionais, ou se tratar de um mecanismo de sobrevivência tumoral, frente a indução da apoptose. Apesar de não ser bem elucidada na literatura, pode haver ainda um feedback entre esses marcadores, onde uma maior expressão de Bcl-2 indicaria uma tentativa do tumor de evadir da apoptose, aumentada pela maior presença das caspases, ou o contrário, onde uma maior expressão de caspases aumentaria justamente para tentar frear os mecanismos anti-apoptóticos induzidos pelo Bcl-2.

Na via intrínseca da apoptose, a Caspase-9, iniciadora, é a responsável pela clivagem da Caspase-3, efetoras, responsável pelo final da cascata apoptótica e a morte da célula em si (24, 25). Diante disso, a correlação do aumento proporcional de Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada como mostrado no trabalho já era algo esperado.

Melanomas orais, apesar de uma baixa incidência, apresentam um prognóstico mais desfavorável em relação ao cutâneo, apresentando um índice de sobrevida após 5 anos entre 15-38%, mostrando-se assim potencialmente fatal (44, 45). Isso se deve principalmente por um diagnóstico tardio (46) e a alta ocorrência de metástases a distância no pulmão e/ou fígado (47) e da heterogeneidade desse tipo de neoplasia (48). A menor expressão de caspase-9 nesse tipo tumoral, quando relacionado aos tumores cutâneos, serve como endosso a esse fato, pois um menor índice da proteína apoptótica indica menor controle da população celular.

Diante dos casos estudados, podemos concluir que existe uma relação entre os marcadores apoptóticos com a proliferação celular, bem como entre eles mesmos e a localização tumoral. Tais eventos demonstram um potencial alvo terapêutico em melanomas caninos, a apoptose, presente em casos com elevado índice proliferativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MILLER, A.J.; MIHM, M.C. Melanoma. **N Engl J Med**. 2006; 355(1): 51–65.
2. 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.
3. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer: pele melanoma. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>. Acesso em 29 Out. 2018.

4. SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v. 451. n. 7176, p. 345–349, 2008.
5. HILL, Z.H.; HILL, G. J. UVA, Pheomelanin and the Carcinogenesis of Melanoma. **Pigmentcellres** , 13 (Suppl. 8): 140 – 144. 2000
6. GROSS, T.L. et al. Clinical and histopatological diagnosis. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat**. 2th ed. BlackwellPublishing, p.406–410. 2005.
7. GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues,. In: MEUTEN, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4th ed. Iowa State Press, Ames, p.45-118. 2002.
8. HERNANDEZ, B. et al. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. **International Journal of Molecular Sciences**. 19, p.394. 2018.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. LEY, R.D. Animal models of ultraviolet radiation (UVR)-induced cutaneous melanoma. **Frontiers in Bioscience**, v.7, p. 1531-1534, 2002.
13. OVERWIJK, W.W.; RESTIFO, N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**. 2001.
14. KUSEWITT, D.F.; LEY, R.D. Animal models of melanoma. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 26, p.35-70, 1996.
15. DELLA PORTA, G. et al. Induction of melanotic lesions during skin carcinogenesis in hamsters. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine Online**, v. 61, p.305-313, 1995.
16. CAINI, S.; GANDINI, S.; SERA, F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinic-pathological variant. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 3054-3063, 2009.
17. REED, J. C.; TOMASELLI, K. J. Drug discovery opportunities from apoptosis research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 586-592, 2000.

18. REED, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. **Trends in molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 314-319, 2001.
19. LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485-495, 2000.
20. LAO, C.D.; DEMIERRE, M; SONDAK, V.K. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, v. 6, n. 11, p. 1559-1568, 2006.
21. SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138, 2003.
22. ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
23. SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861, 2004.
24. MAJNO, G. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis. An Overview of Cell Death. **American Journal of Pathology**, v. 146, 2005.
25. LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **J ClinInvest**, v. 115, n. 10, p. 2665-72, 2005
26. STAUNTON, M. J.; GAFFNEY, Eoin F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. **American journal of clinical pathology**, v. 103, n. 3, p. 300-307, 1995.
27. GLINSKY, G.V. et al. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. **Cancerletters**, v. 115, n. 2, p. 185-193, 1997.
28. GOLDSCHMIDT, M.H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**. p. 38-41. 1998.
29. 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.
30. LEVINE, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-331, 1997.
31. LOWE, S.W. et al. Abrogation of oncogene-associated apoptosis allows transformation of p53-deficient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 6, p. 2026-2030, 1994.
32. SOENGAS, M.S. et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 156-159, 1999.

33. FERNALD, K.; KUROKAWA, M. Evading apoptosis in cancer. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 12, p. 620-633, 2013.
34. OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.
35. ALCOLEA, V. et al. Identification of a Novel Quinoxaline-Isoselenourea Targeting the STAT3 Pathway as a Potential Melanoma Therapeutic. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 521, 2019.
36. YAO, X. et al. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis of human melanoma cells in vivo and in vitro by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway. **Food Funct.** 2019.
37. GHOSH, S. et al. TNF α mediated ceramide generation triggers cisplatin induced apoptosis in B16F10 melanoma in a PKC δ independent manner. **Oncotarget**, v. 9, n. 102, p. 37627, 2018.
38. AL-QATHAMA, A.; GIBBONS, S.; PRIETO, J.M. Differential modulation of Bax/Bcl-2 ratio and onset of caspase-3/7 activation induced by derivatives of Justicidin B in human melanoma cells A375. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 95999, 2017.
39. CHIPUK, J.E. et al. The BCL-2 family reunion. **Molecular cell**, v. 37, n. 3, p. 299-310, 2010.
40. MOHANA-KUMARAN, N. et al. Targeting the intrinsic apoptosis pathway as a strategy for melanoma therapy. **Pigmentcell & melanoma research**, v. 27, n. 4, p. 525-539, 2014.
41. ZHAO, H. et al. resveratrol induces apoptosis in human melanoma cell through negatively regulating erk/PKM2/Bcl-2 axis. **Onco Targets and therapy**, v. 11, p. 8995, 2018.
42. CHENG, Q. et al. Inhibition of SOX4 induces melanoma cell apoptosis via downregulation of NF- κ B p65 signaling. **Oncology reports**, v. 40, n. 1, p. 369-376, 2018.
43. ZHAO, R. et al. Millimeter wave exposure induces apoptosis in human melanoma A375 cells in vitro. **Journal of Southern Medical University**, v. 39, n. 1, p. 76-81, 2019.
44. MARTA, G.N. et al. Melanoma de mucosa oral. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 35-39, 2007.
45. PADHYE, A.; D'SOUZA, J. Oral malignant melanoma: A silent killer?. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 15, n. 4, p. 425, 2011.
46. URATANI, A.M. et al. Oral melanoma: review of the literature. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, p. 428-432, 2016.
47. RAPIDIS, A.D. et al. Primary malignant melanoma of the oral mucosa. **Journal of oral and maxilla facial surgery**, v. 61, n. 10, p. 1132-1139, 2003.

48. MUKHERJEE, N. et al. Alternative treatments for melanoma: targeting BCL-2 family members to de-bulk and kill cancer stem cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 9, p. 2155-2161, 2015.

FIGURAS E LEGENDAS

Figura 1. Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão. Contra-coloração com Giemsa. 200X. Melanoma cutâneo com imunomarcagem citoplasmática para Melan-A em mais de 10% das células neoplásicas.

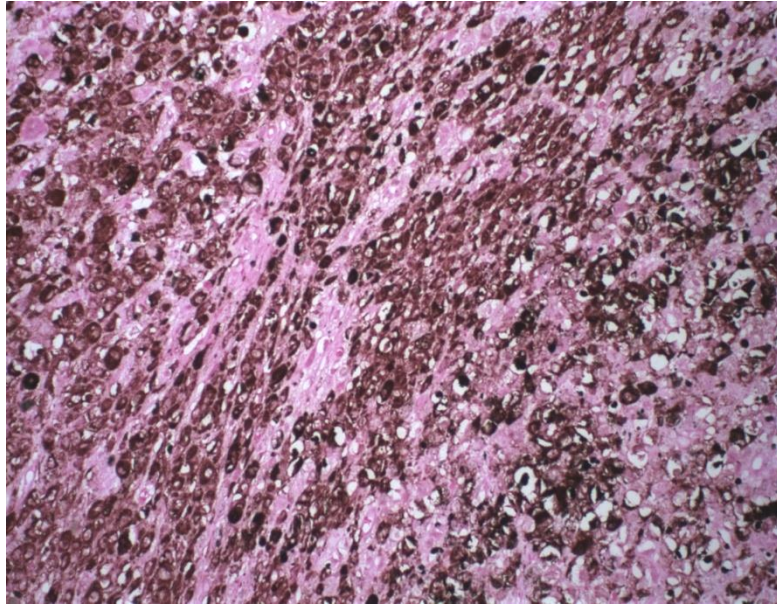


Figura 2. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear fraca e escassa para Ki67. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear forte e difusa para Ki67. C) Melanoma oral. Seta: imunomarcção nuclear fraca e escassa para Ki67. Asterisco: área de pigmentação melânica. D) Melanoma oral com imunomarcção nuclear forte e difusa para Ki67.

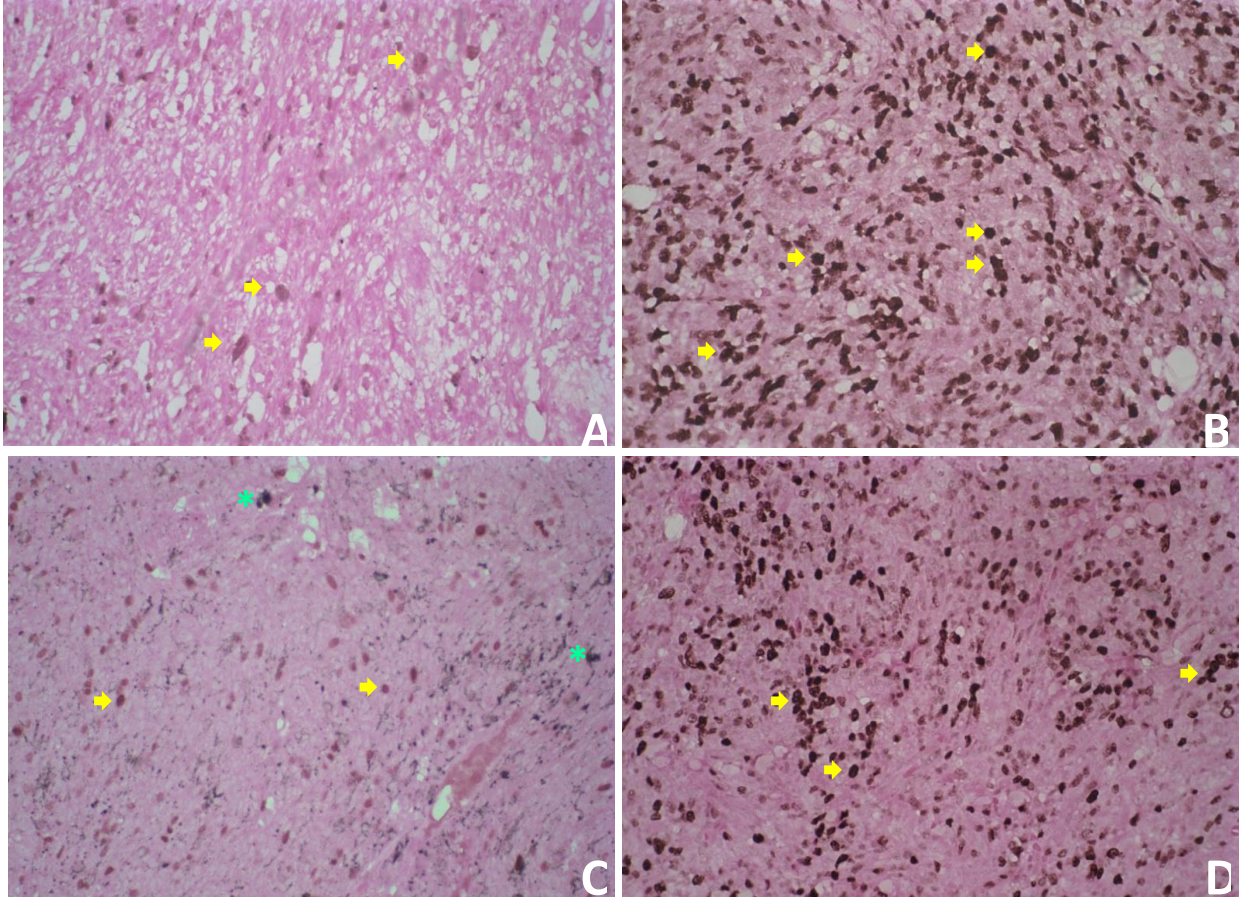


Figura 3. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com rara imunomarcacão fraca citoplasmática para Bcl-2. B) Melanoma cutâneo. Seta: imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte e difusa para Bcl-2. C) Melanoma oral. Seta: imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte e escassa para Bcl-2. D) Melanoma oral. Seta: imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte e difusa para Bcl-2. Asterisco: área de pigmentação melânica.

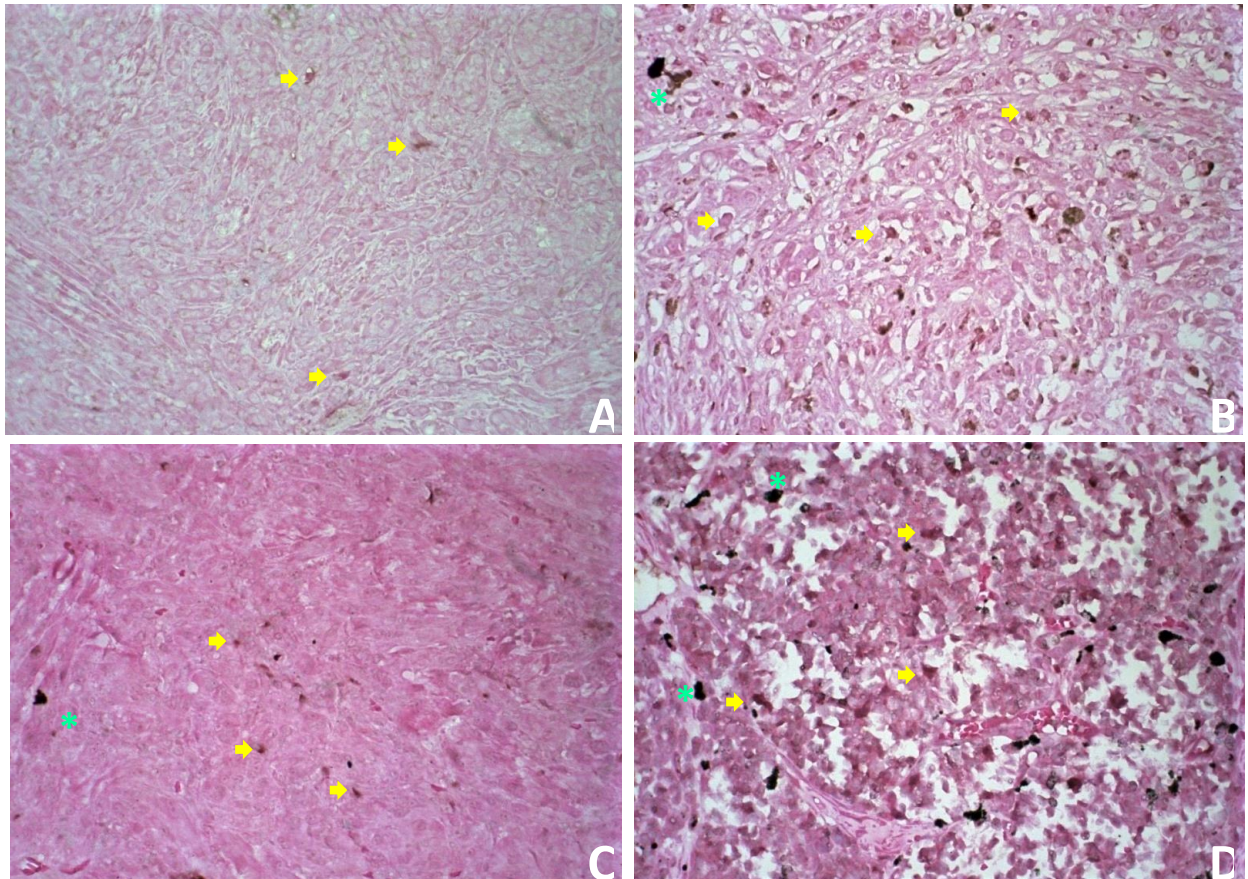


Figura 4. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo.com rara imunomarcção fraca, citoplasmática e nuclear para BAX. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção citoplasmática forte e difusa para BAX. C) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear fraca e escassa para BAX. D) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear forte e difusa para BAX.

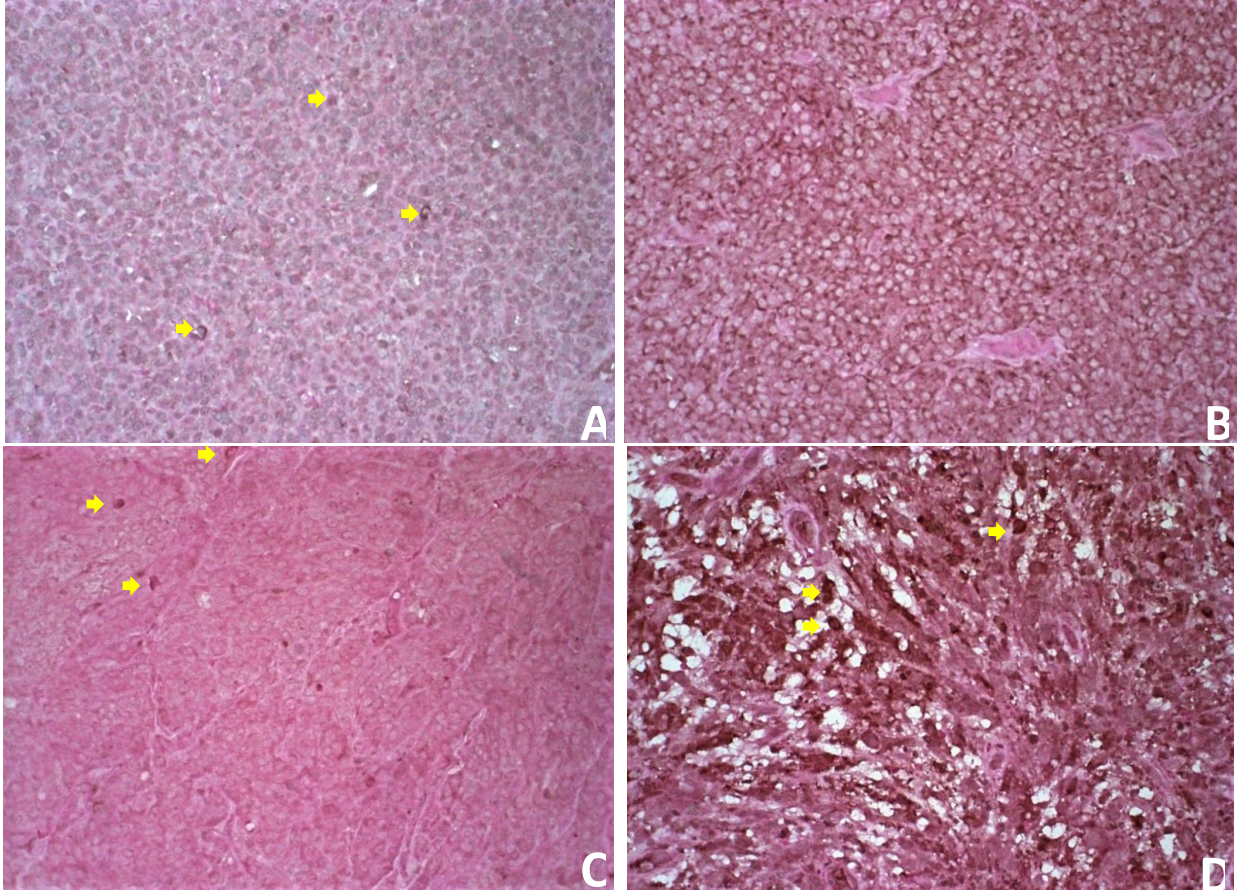


Figura 5. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa. A) Melanoma cutâneo com algumas imunomarcações citoplasmáticas e nucleares fracas para Caspase-3. B) Melanoma cutâneo com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3. C) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear fraca e escassa para Caspase-3. D) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3.

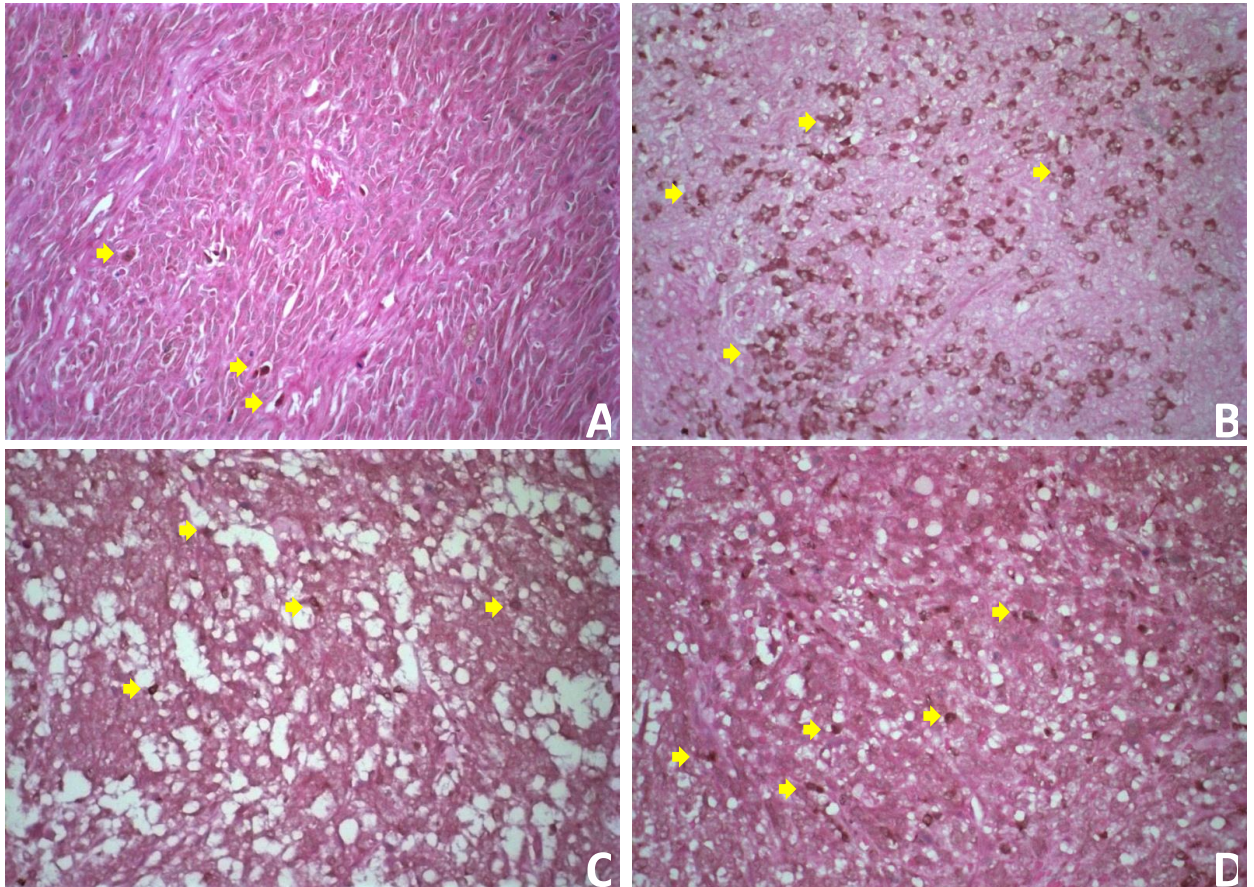


Figura 6. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa e Hematoxilina. A) Melanoma cutâneo com raras imunomarcações citoplasmáticas e nucleares fortes para Caspase-3 clivada. B) Melanoma cutâneo com imunomarcação citoplasmática e nuclear moderada e difusa para Caspase-3 clivada. C) Melanoma oral com rara imunomarcação citoplasmática e nuclear forte para Caspase-3 clivada. D) Melanoma oral com imunomarcação citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-3 clivada.

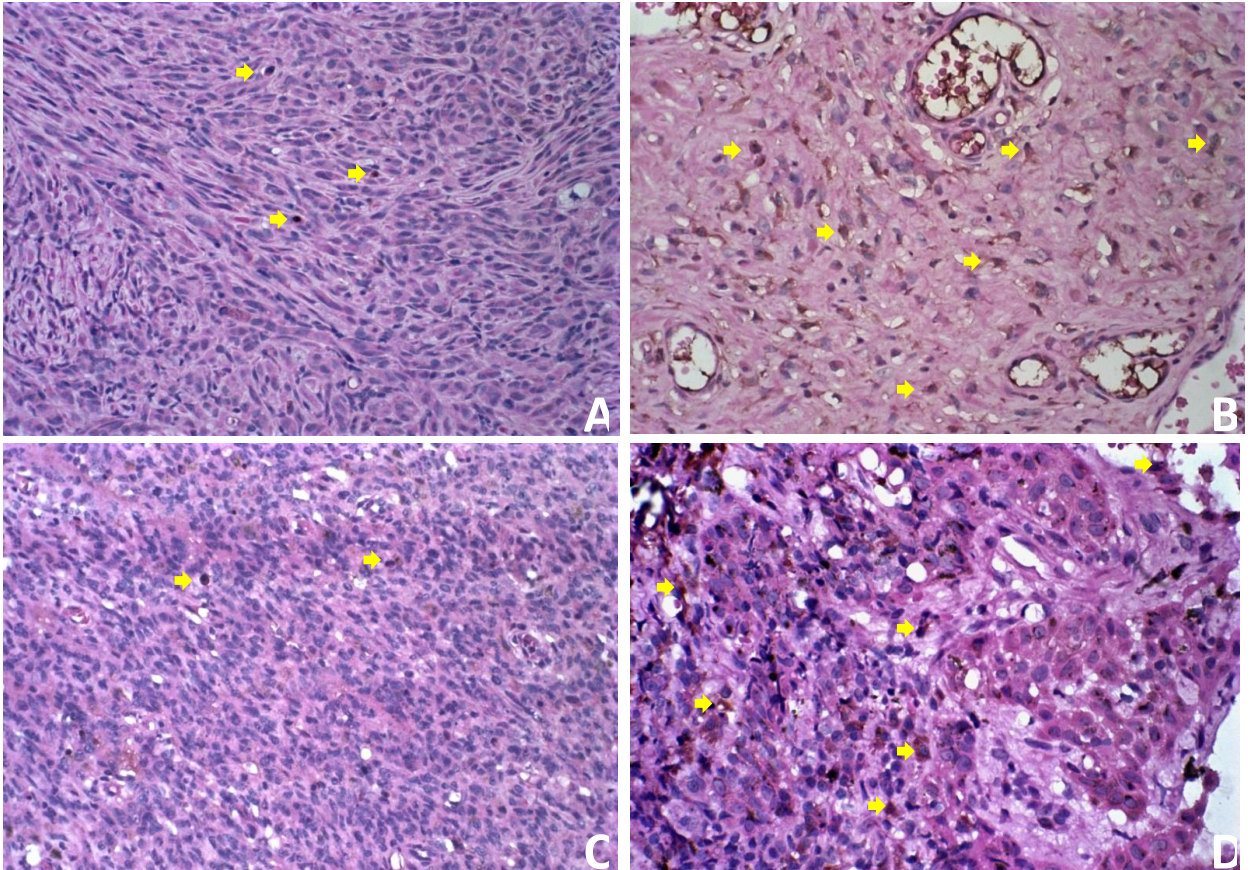


Figura 7. Fragmento de melanoma, imunohistoquímica. Cão. Giemsa e Hematoxilina. A) Melanoma cutâneo com única imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte para Caspase-9 clivada. B) Melanoma cutâneo com imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-9 clivada. C) Melanoma oral com raras imunomarcacões citoplasmáticas fracas para Caspase-9 clivada. D) Melanoma oral com imunomarcacão citoplasmática e nuclear forte e difusa para Caspase-9 clivada.

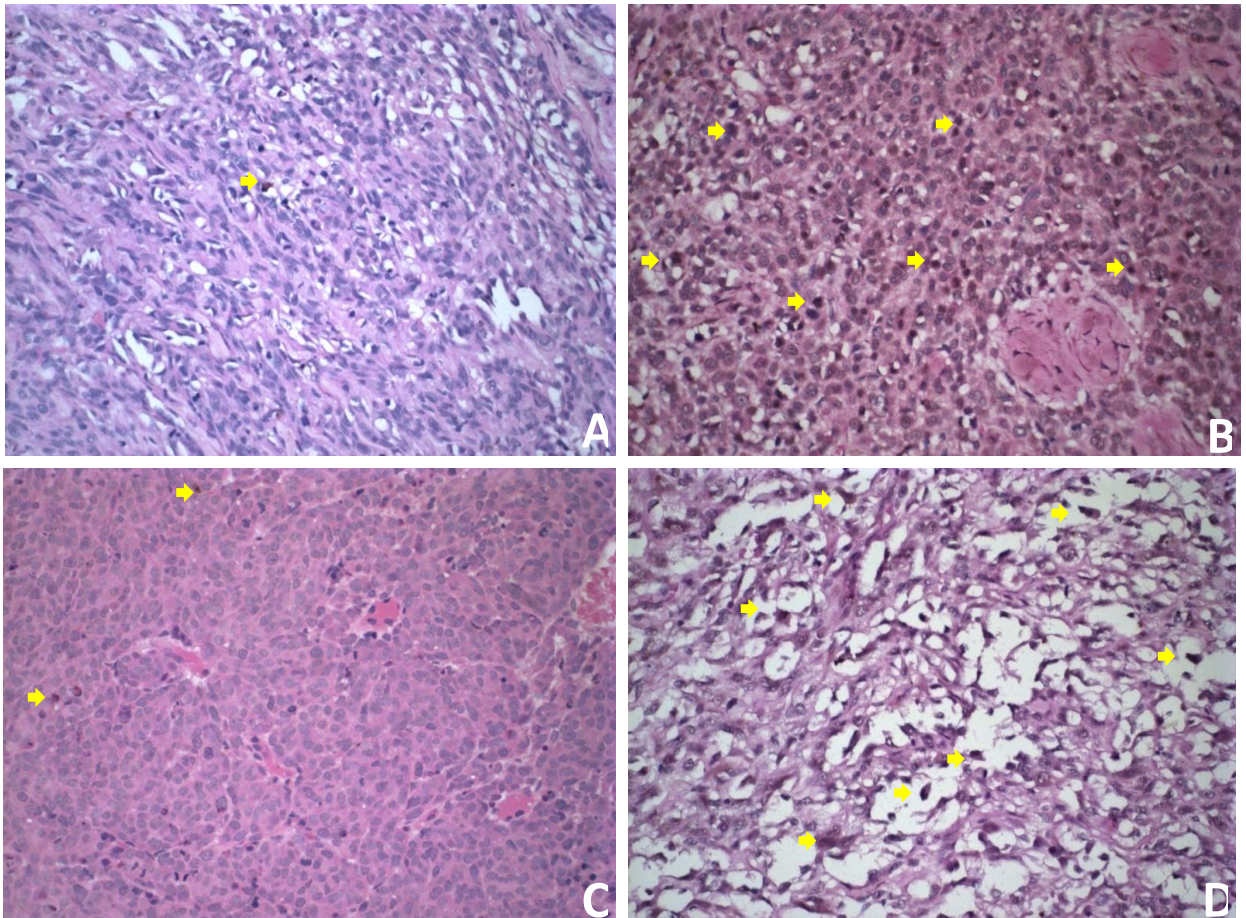


Figura 8. Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Bax e Ki67 em amostras de melanomas caninos. ($r = 0,3852$; $p < 0,05$).

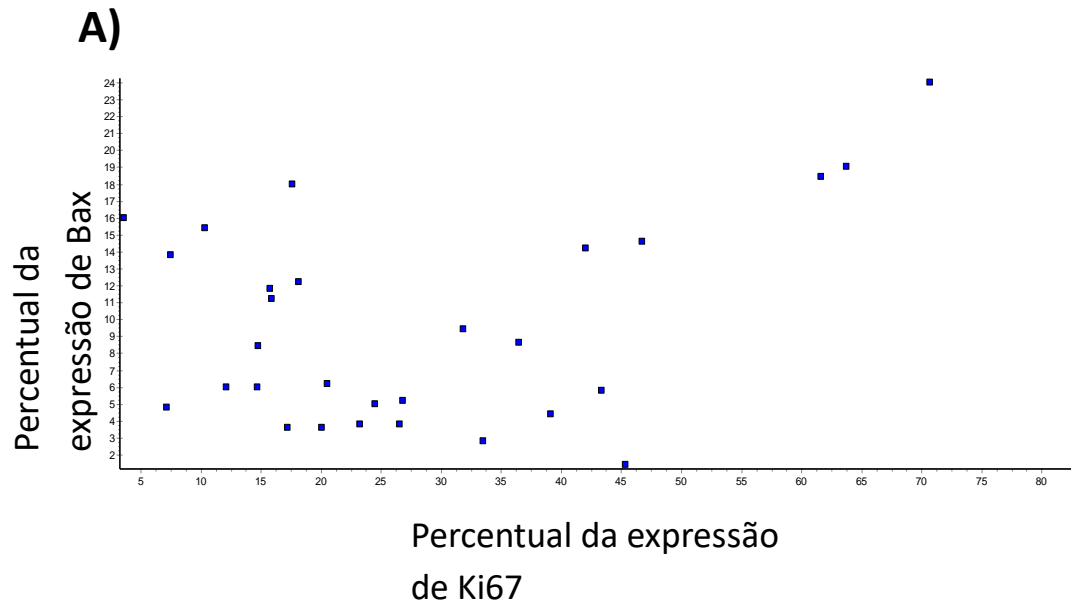


Figura 9. Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-3 clivada e Bcl-2 em amostras de melanomas caninos ($r = 0,6113$; $p < 0,05$).

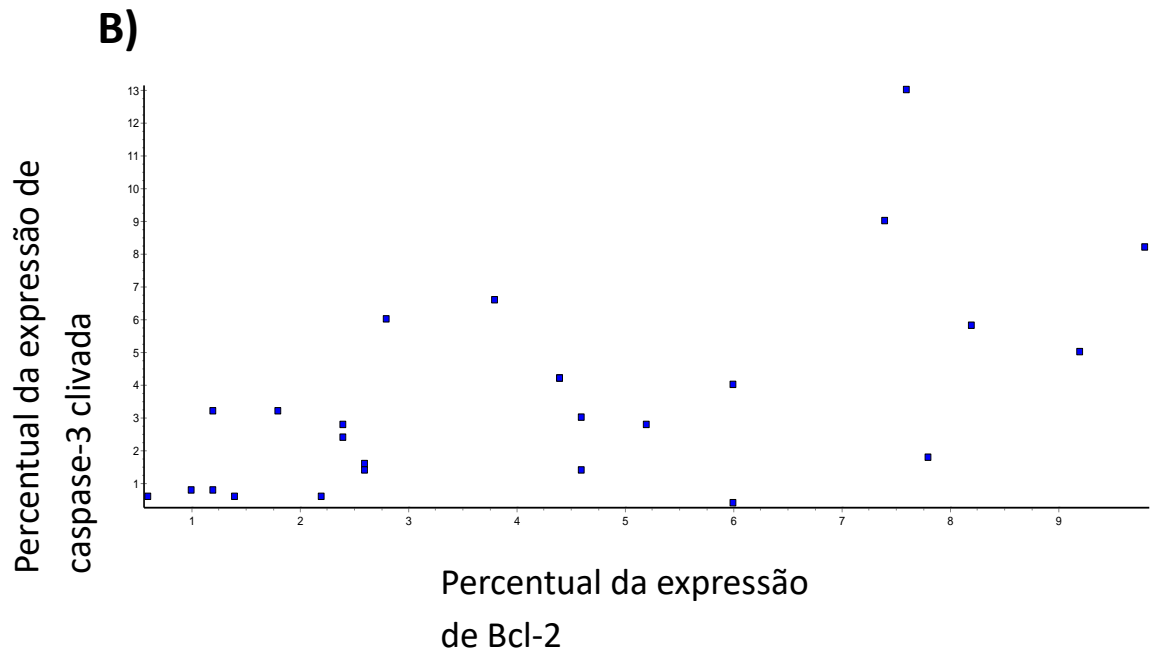


Figura 10. Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-9 clivada e Bcl-2 em amostras de melanomas caninos ($r = 0,5736$; $p < 0,05$).

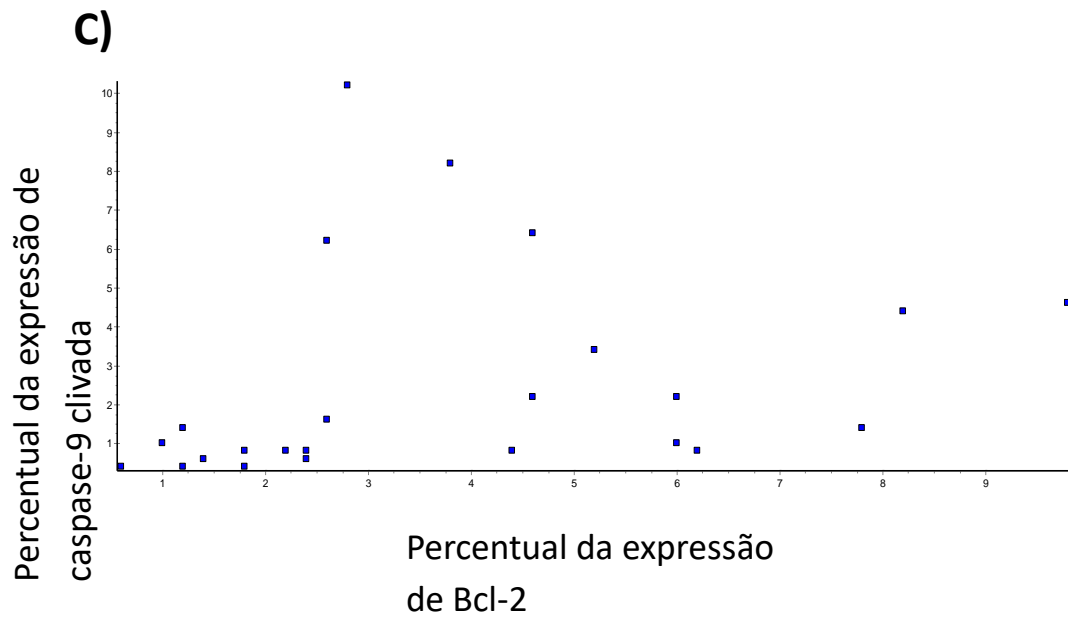


Figura 11. Correlação do percentual da expressão imuno-histoquímica de Caspase-9 clivada e Caspase-3 clivada em amostras de melanomas caninos ($r = 0,6352$; $p < 0,05$).

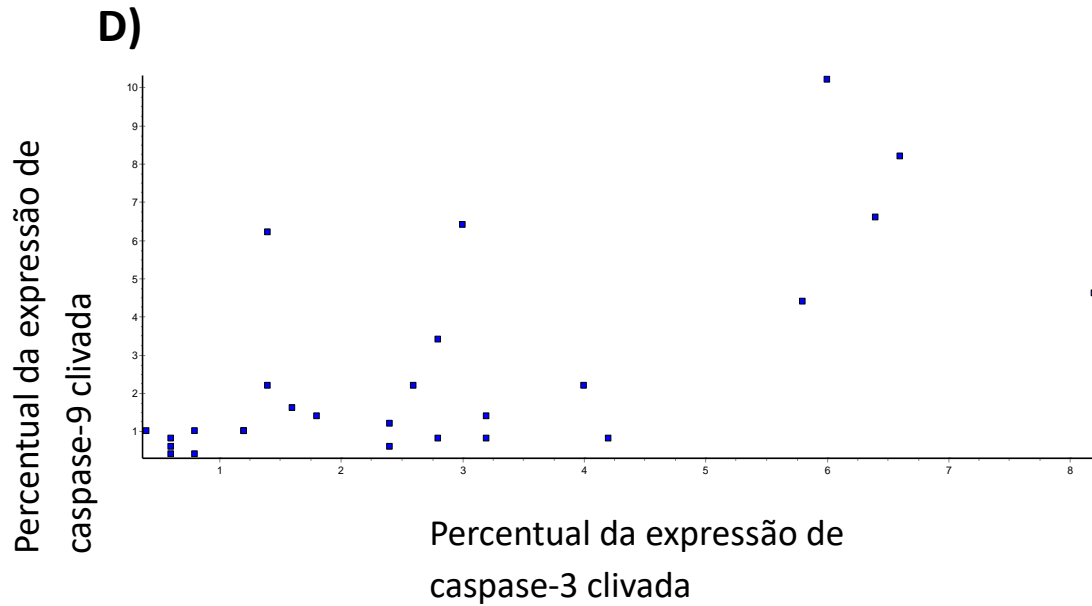
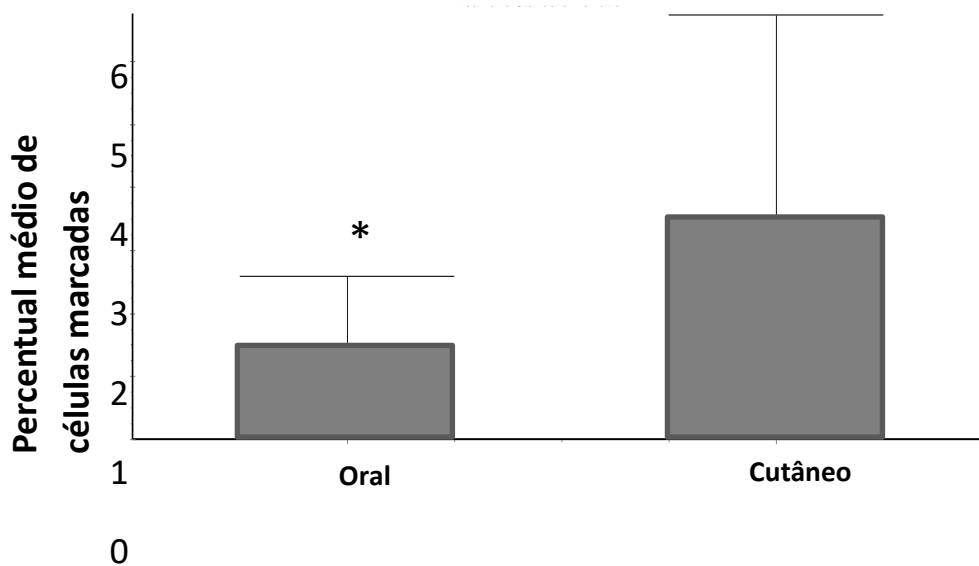


Figura 12. Percentual médio de expressão de Caspase-9 clivada em melanomas caninos orais e cutâneos. Dados expressos por análises de média. Média grupo oral: $1,44\% \pm 1,15\%$; média do grupo: $3,49\% \pm 3,24\%$ ($p < 0,05$).



TABELAS E LEGENDAS

Tabela 1. Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação do anticorpo primário, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário.

<i>Anticorpo</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Tempo de incubação</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Anticorpo secundário</i>
Ki67	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
Melan-A	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
Caspase-3	NeoMarkers	CPP32	1:100	1h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
Caspase-3 clivada	CellSignaling	Asp175	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	HRP
Caspase-9 clivada	CellSignaling	D353	1:100	16h	Citrato + calor úmido	Novolink
Bax	Abcam	Ab7977	1:50	16h	EDTA + calor úmido pressurizado	HRP
Bcl-2	Dako	124	1:50	16h	EDTA + calor úmido pressurizado	HRP

Tabela 2. Percentual das características histológicas analisadas em todas as amostras.

Diagnóstico morfológico			Úlcera	Pigmentação				Desmoplasia	Atividade juncional		Êmbolo
<i>Epitelióide</i>	<i>Fusiforme</i>	<i>Misto</i>		<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>		<i>Lentiginosa</i>	<i>Pagetóide</i>	
80%	17,5%	2,5%	65%	35%	40%	20%	5%	27,5%	30%	25%	42,%

Tabela 3. Percentual médio da expressão imuno-histoquímica em melanomas orais e caninos.

Marcadores	Melanomas Orais	Melanomas Cutâneos
<i>Ki67</i>	32,27% ± 20,67%	25,28% ± 15,42%
<i>Bax</i>	58,6% ± 30,34%	39,06% ± 26,69%
<i>Bcl-2</i>	29,13% ± 20,43%	19,75% ± 13,17%
<i>Caspase-3</i>	51,43% ± 20,47%	65,21% ± 24,52%
<i>Caspase-3 clivada</i>	13,75% ± 9,51%	21,5% ± 16,79%
<i>Caspase-9 clivada*</i>	7,21% ± 5,75%	17,46% ± 16,24%

* P = 0,0347 na comparação de médias entre os melanomas orais e cutâneos.

6. CONCLUSÃO GERAL

Nossos resultados permitiram concluir que:

- i) Existe uma associação diretamente proporcional dos níveis de Ki67 e Bax, sugerindo uma relação entre ao aumento da proliferação celular com o aumento da taxa de apoptose;
- ii) Uma alta expressão de Bcl-2 é acompanhado de maiores índices de Caspase-3 clivada e Caspase-9 clivada, inferindo um possível acúmulo de Bcl-2 não funcional ou até mesmo uma relação de feedback negativo entre os marcadores, numa tentativa das proteínas pró apoptóticas compensarem o aumento da expressão anti-apoptótica ou vice-versa;
- iii) Existe uma correlação entre a expressão de caspases clivadas 3 e 9, explicado por estarem diretamente ligadas uma à outra na via intrínseca da apoptose;
- iv) Melanomas orais, quando comparados aos cutâneos, apresentam a expressão de caspase-9 clivada diminuída, sugerindo que a maior agressividade desse tipo tumoral, pode estar relacionado a uma maior evasão à apoptose pela redução da expressão de caspase 9.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabidamente, o melanoma é uma neoplasia altamente agressiva, com um grande poder de invasibilidade e migração, o que aumenta a taxa de mortes causadas pela doença principalmente pelo comum aparecimento de metástases. Nos melanomas caninos o quadro se apresenta de forma semelhante, sendo agravado pelo fato do diagnóstico ser feito mais tardiamente ainda que em humanos.

Alguns marcadores prognósticos e preditivos são bem estabelecidos para avaliação tumoral e condução das terapias anti-neoplásicas. Proliferação celular e características histológicas, como localização do tumor e presença de êmbolos neoplásicos, já são amplamente usados na oncologia. Porém, nos melanomas, pela heterogeneidade do tumor e uma sabida resistência e baixa resposta às terapias convencionais, torna-se necessário o conhecimento e estabelecimento de novos parâmetros que auxiliarão o estadiamento, acompanhamento e tratamento da doença.

A apoptose está intimamente ligada à progressão tumoral, por ser considerada um processo contrário à divisão celular. Nos melanomas o índice apoptótico se apresenta reduzido e têm-se a apoptose como bom possível alvo terapêutico.

Portanto, estudos direcionados à expressão de proteínas envolvidas em todo o processo apoptótico em melanomas, que busquem elucidar as vias e funções envolvidas com estas moléculas, também carecem de maior atenção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC Supplements**, v. II, p. 81-91, 2013.
- ARMSTRONG, B. K.; GOLDSTEIN, A.M. Epidemiology of Melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-j, Atkins MB, Thompson JF. **Cutaneous Melanoma** 5th Ed. St Louis: Quality Medical Publishing, 2009.
- ARRANGOIZ, R. et al. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. **Journal of Cancer Treatment and Research**, v. 4, p. 1-15, 2016.
- BANDARCHI, B et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. **Dermatology research and practice**, v. 2010, 2010.
- BANDARCHI, B. et al. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 8, p. 644-648, 2013.
- BERGIN, I. L. et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41–53, 2011.
- BERGMAN, P.J. Canine Oral Melanoma. **Clin.Tech. Small Anim.Pract.** 22:55–60, 2007.
- 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.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception?. **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.
- CAINI, S.; GANDINI, S.; SERA, F. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinic-pathological variant. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 3054-3063, 2009.
- CAMARDA, R., WILLIAMS, J., GOGA, A. **In vivo reprogramming of cancer metabolism by MYC**. *Frontiers in cell and developmental biology*. v. 5. p. 1-13. 2017.
- 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, 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.

CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647, 2002.

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 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.

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.

DELLA PORTA, G. et al. Induction of melanotic lesions during skin carcinogenesis in hamsters. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine Online**, v. 61, p.305-313, 1995.

EKEDAHL, H. et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. **British Journal of Dermatology**, v. 169, n. 5, p. 1049-1055, 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

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.

GLINSKY, G.V. et al. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. **Cancerletters**, v. 115, n. 2, p. 185-193, 1997.

GOLDSCHMIDT, M.H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**. p. 38–41. 1998.

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

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.

GROSSMAN, D.; ALTIERI, C. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, n. 1-2, p. 3-11, 2001.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A., **The hallmarks of cancer**. *Cell*. v. 100. p. 57-70. 2000.

HEENEN, M; GIACOMONI, P.U.; GOLSTEIN, P. Individual variations in the correlation between erythematous threshold, UV-induced DNA damage and sun-burn cell formation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 84-87, 2001.

HILL, Z.H.; HILL, G. J. UVA, Pheomelanin and the Carcinogenesis of Melanoma. **Pigmentcellres** , 13 (Suppl. 8): 140 – 144. 2000

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer: pele melanoma. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>. Acesso em 29 Out. 2018.

KAWAKAMI, A.; FISHER, D.E. Key discoveries in melanocyte development. **J Invest Dermatol**, v. 131, n. E1, p. E2-4, 2011.

KATSAMBAS, A.; NICOLAIDOU, E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure: recent developments in epidemiology. **Archives of Dermatology**, v. 132, n. 4, p. 444-450, 1996.

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

KUSEWITT, D.F.; LEY, R.D. Animal models of melanoma. **Journal of Cancer Survivorship**, v. 26, p.35-70, 1996.

LAO, D.; DEMIERRE, M.; SONDAK, V.K. Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, v. 6, n. 11, p. 1559-1568, 2006.

LE DOUARIN, N.M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-4650, 2004.

LEY, R.D. Animal models of ultraviolet radiation (UVR)-induced cutaneous melanoma. **Frontiers in Bioscience**, v.7, p. 1531-1534, 2002.

LIN, Y.; FISHER, D.E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843, 2007.

LOWE, S.W.; LIN, A.W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 485-495, 2000.

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

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.

MILLER, A.J.; MIHM, M.C. Melanoma. **N Engl J Med**. 2006; 355(1): 51–65.

MERKLE, Tanja et al. Acral verrucous malignant melanoma in an immunosuppressed patient after kidney transplantation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 24, n. 3, p. 505-506, 1991.

MODIANO, 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, n. 3, 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.

MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, v. 142, n. 7, p. 1387–1387, 2015.

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.

OVERWIJK, W.W.; RESTIFO, N. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. **Current Protocols in Immunology**. 2001.

PAYETTE, M.J.; KATZ III, M.; GRANT-KELS, J.M. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 1, p. 53-74, 2009.

RASTRELLI, M. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. In: **In vivo**, n. 28, p. 105-1012, 2014.

REED, J. C.; TOMASELLI, K. J. Drug discovery opportunities from apoptosis research. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 586-592, 2000.

REED, J.C. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. **Trends in molecular medicine**, v. 7, n. 7, p. 314-319, 2001.

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.


- SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861, 2004.
- SCHATTON, T. et al. Identification of cells initiating human melanomas. **Nature**, v. 451. n. 7176, p. 345–349, 2008.
- SCHNEIDER, J.S.; MOORE, D.H.; SAGEBIEL, R.W. Risk factors for melanoma incidence in prospective follow-up: the importance of atypical (dysplastic) nevi. **Archives of Dermatology**, v. 130, n. 8, p. 1002-1007, 1994.
- 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.
- 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.
- ŠITUM, M. et al. Melanoma—clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. **Acta DermatovenerologicaCroatica**, 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.
- SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 651–678, 2002.
- SOENGAS, M.S. et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 156-159, 1999.
- SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3138, 2003.
- SOMMER, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. **Pigment cell & melanoma research**, v. 24, n. 3, p. 411-421, 2011.
- STAUNTON, M. J.; GAFFNEY, Eoin F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. **American journal of clinical pathology**, v. 103, n. 3, p. 300-307, 1995.
- TSAO, H. et al. Melanoma: From mutations to medicine. **Genes and Development**, v. 26, n. 11, p. 1131–1155, 2012.
- WEINBERG, R., A. **A biologia do câncer**. Editora Artmed. 2008.
- 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.

WILLYARD, C. Riddle of the rays. **Nature**, v. 515, n. 7527, p. S112, 2014.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V.J. Melanocytes and their diseases. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, p. a017046, 2014.

9. ANEXOS

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

 <p>UFMG</p>	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p>CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 8 / 2016, relativo ao projeto intitulado “EXPRESSAO GENICA E PROTEICA DE MARCADORES PROGNOSTICOS NOS MELANOMAS CANINOS CUTÂNEOS E ORAL”, 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 22/03/2016. Este certificado espira-se em 22/03/2021.</p>	
<p>CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 8 / 2016, related to the Project entitled “GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF PROGNOSTIC MARKERS IN SKIN AND ORAL CANINE MELANOMAS”, 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 22/03/2016. This certificates expires in 22/03/2021.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador (a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 22/03/2016.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</p>	<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br</p>