

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**RENATO FELIPE DA COSTA**

**EXPRESSÃO PROTÉICA SOX2, SOX3, SOX10 E SUA RELAÇÃO COM  
ASPECTOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERATIVOS EM MELANOMAS  
CANINOS ORAIS**

Belo Horizonte

Abril de 2021

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO PROTÉICA SOX2, SOX3, SOX10 E SUA RELAÇÃO COM**  
**ASPECTOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERATIVOS EM MELANOMAS**  
**CANINOS ORAIS**

Belo Horizonte

Abril de 2021

**EXPRESSÃO PROTÉICA SOX2, SOX3, SOX10 E SUA RELAÇÃO COM  
ASPECTOS HISTOLÓGICOS E PROLIFERATIVOS EM MELANOMAS  
CANINOS ORAIS**

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

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte

Abril de 2021

C837e Costa, Renato Felipe da.  
Expressão protéica SOX2, SOX3, SOX10 e sua relação com aspectos histológicos e proliferativos em Melanomas Caninos Orais [manuscrito]. / Renato Felipe da Costa. -- Belo Horizonte: 2021.  
51f.: il.  
Orientador (a): Enio Ferreira.  
Área de concentração: Patologia Investigativa.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Melanoma. 2. Imuno-Histoquímica. 3. Fatores de Transcrição SOXB1. 4. Fatores de Transcrição SOXE. 5. Proliferação de Células. 6. Doenças do Cão. 7. Dissertação Acadêmica. I. Ferreira, Enio. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QU 375

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

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 428 DE RENATO FELIPE DA COSTA**

Realizou-se, no dia 30 de abril de 2021, às 14 horas, no formato *on-line*, a defesa de Dissertação, intitulada *“Expressão Protéica de SOX2, SOX3, SOX10 e sua Relação com Aspectos Histológicos e Proliferativos em Melanomas Caninos Orais”*, apresentada por **Renato Felipe da Costa**, número de registro 2019698204, graduado no curso de Odontologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Enio Ferreira – ICB/UFMG – ORIENTADOR; Profª. Dra. Karine Araujo Damasceno – FIOCRUZ/Bahia; e Prof. Dr. Diego Carlos dos Reis – ICB/UFMG.

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, 30 de abril de 2021.

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.

## **Agradecimentos**

Gostaria de agradecer a Deus por estar comigo todo o tempo durante essa caminhada, e dizer que sou infinitamente grato por tudo que já me proporcionou e por tudo que ainda está por vir.

Agradeço aos meus pais, em especial minha amada mãe que mesmo de longe sempre se fez presente. Sou grato por ter me ajudado a me tornar quem sou e pelos valores que me ensinou, e também a todos meus irmãos e irmãs.

Não posso me esquecer das joias preciosas que a odontologia me deu... minhas amigas que fez a odontologia ser mais bonita e prazerosa. Sou eternamente grato a vocês, Júbila, Vanessa, Gabriela, Monica, Ádna, Marianna e Ana Clara. Amo vocês.

Aos meus eternos mestres, Patrícia Drummond, Amanda Dahdah, Amanda Leijoto, Júlia Mourão, José Leonardo, Natália Cardoso, Suzane Paixão. Vocês foram fonte de inspiração para mais essa conquista. Muito obrigado por terem me feito Cirurgião Dentista.

Taty obrigado por tudo que você me ensinou. Hoje vejo que aquele janeiro extraíndo RNA, fazendo IHQ, contando macrófagos, vasos sanguíneos e Ki67 está me rendendo bons frutos. Sou muito grato por ter feito parte do seu projeto. Deixo aqui minha eterna gratidão.

Ao meu orientador/pai, que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho. Enio, você é uma das pessoas mais humanas que pude conhecer, você me acolheu no seu laboratório como aluno de iniciação científica voluntária sendo aluno externo a UFMG, espero que você possa sempre dar oportunidades como a que me deu a outros alunos externos. Ferreira, você foi mais que um orientador... foi um pai, você me aconselhou, ajudou a tomar decisões, me deu oportunidade que dificilmente outros professores dariam. Sou extremamente grato a você por ter feito essa jornada ser mais leve e divertida. Com muito deboche, é claro.

Ao LCC e a professora Helen muito obrigado! Em especial a Flávia, que tornou uma pessoa especial para mim e contribuiu para que essa caminhada fosse menos pesada.

Muito obrigado a todos!

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

A agressividade do melanoma oral pode estar relacionada à diversas mutações que ocorrem durante o desenvolvimento, tanto em seres humanos quanto na espécie canina. Dentre as diferentes alterações de expressões protéicas observadas nesse tipo neoplásico, é descrita a alteração de proteínas da família SOX. Nesse trabalho, foi avaliada a expressão de SOX2, SOX3 e SOX10 e sua relação com o índice proliferativo e aspectos histológicos indicativos de agressividade em melanomas orais caninos. Foram revisados histologicamente 30 melanomas orais caninos e determinada a expressão de Melan-A, SOX2, SOX3, SOX10 e Ki67 nesses tumores. Todos os tumores apresentaram características histomorfológicas compatíveis com tumores malignos e imunopositividade para Melan-A, confirmando o diagnóstico de neoplasia melanocítica oral maligna. A expressão de SOX2, SOX3 e SOX10 foi observada em 7/30 (23,33%), 20% (6/30) e 23/30 (76,67%) dos casos, respectivamente. Dentre os marcadores analisados, destacou-se a relação entre a maior expressão de SOX3 em tumores com menores índices proliferativos. Além disso, foi observada também uma correlação inversa entre a expressão SOX10 citoplasmática e SOX10 nuclear em células neoplásicas, sugerindo uma mudança da localização dessa proteína em melanomas orais. Aparentemente, dentre as proteínas da família SOX estudadas, sugere-se que a proteína SOX3 apresenta um importante papel na regulação da proliferação celular em melanomas orais e sugere-se que as proteínas SOX2 e SOX10 são expressas constitutivamente nessas neoplasias, sem um papel determinante para a agressividade. Novos estudos dessa via de transcrição gênica, podem auxiliar em possíveis determinações prognósticas e preditivas da proteína SOX3 no melanoma canino oral.

**PALAVRAS CHAVES:** Melanoma, Imuno-histoquímica, Fatores de transcrição SOXB1, Fatores de transcrição SOXE, Proliferação celular, Doença cão.



## **ABSTRACT**

The aggressiveness of oral melanoma can be related to several mutations that occur during development, both in humans and in the canine species. Among the different changes in protein expression observed in this neoplastic type, the change in proteins of the SOX family is described. In this work, the expression of SOX2, SOX3, and SOX10 and its relationship with the proliferative index and histological aspects indicative of aggressiveness in canine oral melanomas were evaluated. Thirty canine oral melanomas were histologically reviewed and the expression of Melan-A, SOX2, SOX3, SOX10, and Ki67 in these tumors were determined. All tumors presented histomorphological characteristics compatible with malignant tumors and immunopositivity for Melan-A, confirming the diagnosis of malignant oral melanocytic neoplasia. The expression of SOX2, SOX3, and SOX10 was observed in 7/30 (23.33%), 20% (6/30), and 23/30 (76.67%) of the cases, respectively. Among the analyzed markers, the relationship between the higher expression of SOX3 in tumors with lower proliferative indexes was highlighted. An inverse correlation was also observed between the expression cytoplasmic SOX10 and nuclear SOX10, suggesting a change in the location of this protein in oral melanomas. Apparently, among the SOX family proteins studied, the SOX3 protein plays an important role in the regulation of cell proliferation in oral melanomas, and it is suggested that the SOX2 and SOX10 proteins are constitutively expressed in these neoplasms, without a determining role for aggressiveness. New studies of this gene transcription pathway may assist in possible prognostic and predictive determinations of the SOX3 protein in oral canine melanoma.

**Keywords:** Melanoma, Immunohistochemistry, SOXB1 Transcription Factors, SOXB1 SOXE Transcription Factors, Cell Proliferation, Dog Diseases.

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1.1) Melanoma em humanos: aspectos clínicos.....	5
1.2) Melanomas em cães: aspectos clínicos.....	8
1.3) Marcadores oncogênicos em melanomas .....	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1) Objetivo geral.....	14
2.2) Objetivos específicos .....	15
3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4. ARTIGO.....	16
5. CONCLUSÃO GERAL .....	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
7. REFERÊNCIAS .....	37
8. ANEXOS.....	46
8.1) Certificado de Aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais .....	46
8.2) Tabela com informações dos casos utilizados.....	47

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1) Melanoma em humanos: aspectos clínicos

O melanoma é uma neoplasia derivada dos melanócitos, células produtoras de melanina que estão presentes na pele, mucosas, meninges e úvea (CHOPRA, SHARMA e RAO, 2020). Por ser um tipo neoplásico raro em humanos, principalmente em casos orais, podemos observar que poucos estudos abordam a fundo a sua patogênese e terapêutica (SPENCER e MEHNERT, 2016). O melanoma oral possui um distinto comportamento em relação ao melanoma cutâneo e mucocutâneo, referente a etiologia, patogênese, epidemiologia e prognóstico (POSTOW, HAMID e CARVAJAL, 2012).

Devido a baixa incidência, poucos autores desenvolvem pesquisas relacionada ao melanoma oral. Contudo, essa neoplasia apresenta maiores chances de recidiva após a manobra cirúrgica, possui comportamento mais agressivo e maior propensão a metástase, quando comparado com o melanoma cutâneo (MELETI, LEEMANS, *et al.*, 2007; GORSKY e EPSTEIN, 1998).

A patogênese do melanoma oral permanece desconhecida, diferente do melanoma cutâneo que possui relação com exposição prolongada aos raios ultravioleta. Mutações frequentemente observadas em melanomas cutâneos, como BRAF NRAS, são encontradas em baixa frequência nos melanomas orais (BUERY *et al.*, 2011; ALAEDDINI e ETEMAD-MOGHADAM, 2015; MOREIRA, SANTOS, *et al.*, 2010; VIKEY e VIKEY, 2012). Estudos comparativos relacionados à etiopatogenias de melanomas mucosos e cutâneos, destacam-se os genes SF3B1 e KIT, frequentemente mutados em melanomas orais, e os genes NRAS e BRAF, mais comumente mutados em melanomas cutâneos (NASSAR; TAN, 2020). O tratamento e a compreensão vem sendo aprimorados baseado em feitos na oncogênese do melanoma cutâneo exposto radiação UV, porém a escassez de amostras de melanoma oral dificulta a identificação

de condutores oncogênicos e o entendimento deste tipo neoplásico (FURNEY *et al.*, 2013).

O melanoma oral é considerado um subtipo altamente agressivo, principalmente quando são diagnosticados tardiamente, já com envolvimento linfonodal (ALICEA; REBECCA, 2021). Embora todos os grupos étnicos possam ser acometidas por essa neoplasia, os indianos, japoneses e africanos possuem maior incidência dessa doença, sendo os japoneses a população mais acometida, principalmente pacientes do sexo masculino (MENDENHALL, AMDUR, *et al.*, 2005; ZITO e MAZZONI, 2020).

No Brasil o melanoma mucoso é frequentemente observado na sexta década de vida, sendo a cavidade oral e lábios os locais mais acometidos, já em estágio avançado na maioria dos casos. Tamaña agressividade dos melanomas orais pode ser atribuída a frequência de diferentes aberrações genéticas comparados ao melanoma cutâneo, conduzindo o indivíduo a um pior prognóstico e menor tempo de sobrevivida (ALBUQUERQUE *et al.*, 2020; BENEVENUTO DE ANDRADE *et al.*, 2012; COHEN GOLDEMBERG *et al.*, 2020).

A maioria dos diagnósticos dessas lesões são realizados em fase avançada da doença. Normalmente os melanomas orais são diagnosticados apenas quando se tem um crescimento vertical considerável, presença de ulceração e hemorragias (ASCIERTO, ACCORONA, *et al.*, 2017; GUEVARA-CANALES, GUTIÉRREZ-MORALES, *et al.*, 2012). Esse fator é preocupante, pois o pior prognóstico dessa doença está diretamente relacionado com o diagnóstico tardio da lesão, apresentando uma sobrevivida desfavorável, em torno de 18 meses a 5 anos após o diagnóstico inicial (ASCIERTO, ACCORONA, *et al.*, 2017; MICHEL, PERRET-COURT, *et al.*, 2014). O melanoma possui grande chance de promover metástases para linfonodos e para órgãos distantes como, fígado e pulmão, (PATTON, BRAHIM, *et al.*, 1994; TACASTACAS, BRAY, *et al.*, 2014 ).

São desconhecidos os fatores de risco do melanoma oral (ALI, YOUSAF e LARKIN, 2013). Além da radiação Ultravioleta outros agentes foram descartados, como os fatores virais como o vírus do herpes humano e o vírus do papiloma humano, por não

apresentarem associação com a carcinogênese do melanoma oral (SPENCER e MEHNERT, 2016; PATRICK, FENSKE e MESSINA, 2007; POSTOW; HAMID; CARVAJAL, 2012). Quanto as substâncias carcinogênicas do tabaco e o efeito do aldeído, não se tem uma resposta concreta de sua atuação sob os melanócitos (SPENCER e MEHNERT, 2016; PATRICK, FENSKE e MESSINA, 2007). Porém, outros autores sugerem que próteses mal adaptadas, irritações crônicas, vírus do papiloma humano e o tabaco podem de alguma forma desconhecida exercer papel sob a iniciação no melanoma oral (MELETI, LEEMANS, *et al.*, 2006; GU, EPSTEIN e JR, 2003; RAPINI, GOLITZ, *et al.*, 1985).

Em humanos, o melanoma pode apresentar morfologia celular e padrões de crescimento distintos. Essa variedade extensa de apresentação de padrões morfológicos das células neoplásicas pode dificultar o diagnóstico de melanomas orais, especialmente quando se trata de melanomas amelanóticos (KAUNITZ *et al.*, 2017). O melanoma cutâneo apresenta subtipos histológicos que podem ser definidos de acordo com o componente intradérmico do melanoma, como lentigo maligno, lentiginoso acral, extensivo superficial e nodular. O melanoma invasor do lentigo é caracterizado pela exposição crônica aos raios solares e possui incidência maior em indivíduos acima dos 60 anos, uma vez que esta região recebe maior incidência de raios solares. Esse tipo de melanoma é comumente diagnosticado em cabeça e pescoço devido esta área ser mais incidente de raios solares. O perfil histológico apresenta proliferação lentiginosa de melanócitos neoplásicos atípicos em epiderme atrófica (DUNCAN, 2009) (FERRARI *et al.*, 2008). O padrão lentiginoso acral possui evolução lenta, demonstra proliferação atípica de melanócitos hiperpigmentados, descontínuos na região dermoepidérmica com crescimento pagetóide (BRADFORD *et al.*, 2009). O padrão extensivo superficial associa-se com queimaduras, exposição intermitentes aos raios solares, e nevos melanocíticos. Histologicamente, essa lesão apresenta melanócitos epitelióides com formação de ninhos, com crescimento pagetóide (DUNCAN, 2009; KVASKOFF; SISKIND; GREEN, 2012). O padrão nodular apresenta-se com formação de nódulos enegrecidos e não apresentar área *in situ*. Histologicamente essa lesão mostra maior espessura em menor tempo, é uma neoplasia extremamente invasora e demonstra pior prognóstico (DUNCAN, 2009; POLLACK *et al.*, 2011). As características cutâneas de malignidade podem ser encontradas em melanomas orais, destarte, as características

mais comumente encontradas em melanomas orais são lentiginoso acral (lentiginoso da mucosa) e em menor frequência o tipo extensivo superficial (MENDENHALL *et al.*, 2005).

## 1.2) Melanomas em cães: aspectos clínicos

O melanoma oral assim como outras neoplasias que acometem a cavidade oral não são de carácter exclusivo da espécie humana. Existem diferentes modelos, *in vitro* e *in vivo*, que demonstram comparativamente a carcinogênese e o comportamento do melanoma oral e são de suma importância para correlacionar o processo tumoral e melhor entendimento do processo neoplásico em seres humanos (KUSEWITT e LEY, 1996; LEY, 2002; SIMPSON, BASTIAN, *et al.*, 2013).

Semelhante à espécie humana, os cães são comumente acometidos pelo melanoma oral. Por terem uma maior incidência dessa neoplasia, além de apresentarem características histopatológicas, moleculares, comportamento clínico extremamente semelhantes ao observados em humanos, diferentes trabalhos sugerem o cão como um bom modelo de estudo comparativo do melanoma oral (WONG, WEYDEN, *et al.*, 2019; SCHIFFMAN e BREEN, 2015; WEYDEN, PATTON, *et al.*, 2016).

Além da cavidade oral, os cães possuem diferentes sítios de acometimentos de melanoma, como pele, regiões genitais muco-cutâneas, região ungueal, olhos e meninges. Sendo o melanoma oral o que possui comportamento mais agressivo em relação aos demais (BOSTON, LU, *et al.*, 2014). Dentre os melanomas em cães, o melanoma oral é o mais frequente e pode ser observado principalmente no palato duro, gengiva, tonsilas palatinas, língua, lábios e orofaringe (PROUTEAU e ANDRÉ, 2019). É bem descrito que 97% dos tumores melanocíticos na cavidade oral mostram um comportamento extremamente agressivo e alto índice metastático (GILLARD, CADIEU, *et al.*, 2014). Recentemente, foi demonstrado em um estudo que os cães acometidos por melanoma oral apresentaram prevalência de até 51% de metástase pulmonar (PROUTEAU e ANDRÉ, 2019).

Os melanomas apresentam subtipos histológicos diferentes e podem apresentar-se com padrões celulares do tipo epitelióide, fusiforme ou misto (SPANGLER, 2006). O melanoma epitelióide apresenta melanócitos neoplásicos poligonais/epitelióide arranjados em ninhos ou cordões, enquanto o melanoma fusiforme as células mostram-se alongadas ou ovaladas e estão dispostas em feixes contínuos. Tumores com o padrão misto apresentam ambos padrões com presença de células em anéis de sinete e balanóide (SPANGLER, 2006; SMEDLEY, SPANGLER, *et al.*, 2011). O melanoma de células claras ou balanóide é um tipo de melanoma bastante incomum, este padrão celular pode ser visto na cavidade oral de cães e gatos bem como na pele. Nesta variação do melanoma, as células apresentam citoplasma palidamente eosinofílico, grânulos finos levemente amarronzados, os núcleos são volumosos com presença de nucléolos proeminentes, anisocariose variável e cromatina marginalizada (DITERS e WALSH, 1984; RAMOS-VARA, BEISSENHERZ, *et al.*, 2000; LINDE-SIPMAN, WIT, *et al.*, 1997). A variante anel de sinete não apresenta grânulos de melanina, as células apresentam pleomorfismo, núcleos achatados e excêntricos, algumas células podem exibir corpos de inclusão intracitoplasmáticos pálidos adjacentes aos núcleos (GROSS, IHRKE e WALDER, 1992; DITERS e WALSH, 1984).

O melanoma oral apresenta comportamento agressivo, dentre algumas características clínicas pode citar alguns sinais brandos como uma simples halitose ou até mesmo fratura mandibular em casos que a doença já se encontra numa fase mais avançada. (LUNA, HIGGINBOTHAM, *et al.*, 2000; SMITH, GOLDSCHMIDT e MCMANUS, 2002). Dentre as formas de tratamentos disponíveis para essa neoplasia pode-se destacar a excisão cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, visto que a cirurgia juntamente combinada com quimioterapia demonstram melhores resultados e com isso uma menor chance de recidiva e um tempo de sobrevida (NISHIYA, MASSOCO, *et al.*, 2016). A mais promissora forma de tratamento até o presente momento é a imunoterapia, uma vez que ensaios clínicos mostram resultados promissores como aumento na sobrevida global e melhora clínica de pacientes portadores de melanoma canino (ROBERT, RIBAS, *et al.*, 2014; SCHADENDORF, HODI, *et al.*, 2015; MAEKAWA, KONNAI, *et al.*, 2014).

Novas terapias vêm sendo testadas e estas apresentam resultados bastante esperançosos, pode-se destacar o lupeol e a viroterapia oncolítica. O lupeol é um composto extraído de plantas e frutas. Em um estudo, este composto demonstrou resultados antiproliferativos *in vitro* e *in vivo* em células de melanoma, além de inibir a proliferação de melanócitos neoplásicos, onde foi observado que não houve a formação de metástases (YOKOE, AZUMA, *et al.*, 2015). Já a viroterapia oncolítica consiste na infecção das células neoplásicas por vírus, o mesmo destrói as células cancerosas durante a replicação, sendo assim, estudos mostraram que a oncolise tumoral apresentou bons resultados em seis linhagens de células de melanoma canino LMeC, CMGD2, CMGD5, CMeC1, CMeC2 e KMeC (IGASE, HWANG, *et al.*, 2015).

### 1.3) Marcadores oncogênicos em melanomas

O melanoma, assim como outras neoplasias, possui um complexo processo carcinogênico, envolvendo diversas moléculas, vias e estruturas celulares. Para ter-se um acompanhamento e melhor entendimento do desenvolvimento tumoral podemos lançar mão de diversas análises biomoleculares (BANDARCHI, JABBARI, *et al.*, 2013).

É bem descrito na medicina humana que no melanoma cutâneo os melanócitos neoplásicos possuem proliferação descontrolada após ativação da proteína quinase ativadora de mitose (MAPK), que por vez induz o crescimento neoplásico. A ativação dessa via se dá por mutações somáticas do *NRAS* e do *BRAF*, presente em 15% e 50% dos melanomas, respectivamente, (EKEDAHL, CIRENAJWIS, *et al.*, 2013; MILLER e MARTIN C. MIHM, 2006). Desta forma a relação das alterações dessa via com o comportamento e prognóstico em melanomas orais não está esclarecido, visto que as mutações *NRAS* e *BRAF* são incomuns em células de melanoma oral (FELLER, KHAMMISSA e LEMMER, 2017). Mesmo a ativação de *NRAS* e *BRAF* serem incomuns em melanomas orais, a ativação da via MAPK é muito comum tanto em humanos quanto em cães (MEIER, BUSCH, *et al.*, 2007). Recentemente, foram produzidos novos medicamentos para tratamento de melanoma, porém estes medicamentos tiveram resultados mais promissores naqueles tumores que apresentavam



a mutação de *BRAF*, sendo assim não apresentam valia para tratamento de melanoma oral. Neste mesmo estudo pode ser comprovado que ambas as espécies demonstram similaridade a inibição da via *MAPK* (FOWLES, DENTON e GUSTAFSON, 2015). Outras mutações além dos genes *NRAS* e *BRAF* podem ser observados nos melanomas orais humanos e caninos, variação do nucleotídeo único (SNV), *PTPRJ*, *BRCA1* e *BRCA2* mostram-se alterados comumente entre as espécies. Destarte, humanos e cães que apresentam mutações *BRCA2* podem ser sensíveis a inibidores PARP (WONG *et al.*, 2019; NEWELL *et al.*, 2019).

Para a avaliação da proliferação celular a maioria dos estudos utilizam a análise imunohistoquímica da proteína Ki67, extremamente eficaz e muito sensível, por ser expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0. A quantificação de células neoplásicas positivas para Ki67 mostra-se confiável para avaliação da proliferação celular, agressividade tumoral, avaliação prognóstica e risco de desenvolvimento metastático (BROWN e GATTER, 2002; WEINSTEIN, LEININGER, *et al.*, 2014). Quanto maior o índice proliferativo, pior é o prognóstico e menor o tempo de sobrevida do paciente. (MA, WU, *et al.*, 2017). Para avaliação do índice proliferativo a partir do Ki67 alguns autores usam ponto de corte para definirem em alta e baixa proliferação. Em humanos, casos que apresentam porcentagem de até 10% são considerados de baixa proliferação, média proliferação de 10% a 20% e alta proliferação aqueles que apresentam valores superiores a 20% (RAMSAY, FROM, *et al.*, 1995). Outros autores consideram apenas como índice proliferativo alto e baixo, deste modo considerando alto índice proliferativo  $\geq 20\%$  e baixo  $< 20\%$  (GIMOTTY, BELLE, *et al.*, 2005). A referência do ponto de corte mais aceitável e mais utilizado para avaliação do índice proliferativo em melanomas orais em cães é 19,5% para correlação entre os parâmetros histológicos e outras avaliações clínicas (BERGIN *et al.*, 2011).

A sobrevida em cães com melanoma oral utilizando Ki67 tem sido atribuído parâmetros histológicos, como índice mitótico e atipia nuclear. Os valores de Ki67, índice mitótico e atipia nuclear proporcionaram bom desempenho na avaliação da previsão de morte por melanoma. A determinação de um ponto de corte de 19,5% de índice de expressão de Ki67, em melanomas orais, mostrou-se eficiente nessa determinação prognóstica em cães (BERGIN *et al.*, 2011). Em humanos, a baixa expressão de Ki67 com ponto de

corde <20%, mostrou estar relacionado a uma melhor sobrevida do paciente. (MA *et al.*, 2017).

Além de marcadores de proliferação, mostra-se necessário o uso de outros marcadores para se compreender a biologia tumoral em melanomas, sendo assim o estudo das proteínas da família SOX em melanomas podem apresentar novas expectativas para desenvolvimento de novas técnicas terapêuticas. O gene codificante dessa proteína está localizado na região determinante do sexo Y e assim foi determinada a *região determinante do sexo Y* (SRY) gene (GUBBAY, COLLIGNON, *et al.*, 1990). Sry faz ligações ao DNA através de seus domínios com o grupo de alta mobilidade (HMG), HMG possui semelhança de 50% com os domínios HMG de Sry. No momento atual, tanto para o genoma humano quanto o genoma murino estão documentados 20 genes de SOX, subdivididas em grupos de acordo com a função e sequência (WEGNER, 2010; WEINA e UTIKAL, 2014). No presente estudo abordaremos o papel da SOX2, SOX3 pertencentes ao subgrupo SOXB1 e a proteína SOX10 pertencente ao subgrupo SOXE.

Possivelmente o gene SOX2 possui maior conhecimento pela função nas células tronco pluripotentes, pois entre todas as espécies seu domínio HMG permanece extremamente conservado (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; STEVANOVIC, ZUFFARDI, *et al.*, 1994). Para que diversos processos de desenvolvimento aconteçam a expressão de SOX2 é crucial, visto tal importância para o desenvolvimento, embriões morrem por deficiência de SOX2 após sua implantação (AVILION, NICOLIS, *et al.*, 2003). Diversos estudos mostram que a desregulação de SOX2 contribui como fator de suma importância para a patogênese do câncer, deste modo diversos autores demonstraram que a SOX2 desempenha diversos papéis em células neoplásicas, bem como resistência a apoptose, transição epitélio mesênquima, proliferação, resistência terapêutica, iniciação neoplásicas, invasão, migração e metástase (WEINA e UTIKAL, 2014; HÜSER, NOVAK, *et al.*, 2018). No melanoma, existe opiniões controversas sobre sua atividade. Schaefer *et al.*,(2017) mostraram que a deleção de SOX2 em melanoma humano e a inativação em camundogos não implicou alterações no crescimento, iniciação tão pouco na metástase (SCHAEFER, SEGALADA, *et al.*, 2017), em contrapartida, WEINA *et al.*,(2016) já havia comprovado que a superexpressão de SOX2 induzia em melanócitos neoplásicos maior capacidade de invasão (WEINA, WU,

*et al.*, 2016). Até o presente momento não foram publicados estudos evidenciando a participação de SOX2 em melanomas da mucosa oral em cães, porém foi realizado um estudo em adenomas hipofisários corticotróficos caninos, o qual foi avaliada a expressão de SOX2, mas não se obteve resultados promissores, visto que não obtiveram correlação entre diagnóstico histológico e parâmetros clínicos (RIJN, POUWER, *et al.*, 2015).

SOX3 é altamente conservado e está diretamente ligado no desenvolvimento de processos extremamente importantes, como desenvolvimento craniofacial, hipófise, neurogênese e formação dos testículos (BYLUND, ANDERSSON, *et al.*, 2003; RAVEROT, WEISSUSAN, *et al.*, 2005). A expressão de SOX3 no sistema nervoso central é alta e à medida que tecido vai amadurecendo, essa expressão vai diminuindo e ocorre a conversão de proliferação para diferenciação (UWANOGHO, REX, *et al.*, 1995). Sua atividade em tumores está relacionada com migração, invasão e proliferação. A sua superexpressão no câncer de ovário está diretamente ligada a adesão de células tumorais. Além disso, existem evidências que SOX3 possui um comportamento semelhante ao um oncogene (YAN, WANG, *et al.*, 2016; UWANOGHO, REX, *et al.*, 1995). A superexpressão de SOX3 está presente vários tumores, carcinoma de ovário, carcinoma hepatocelular, carcinoma espinocelular esofágico, câncer de pulmão de células pequenas, osteossarcoma, porém não se sabe o comportamento de SOX3 no melanoma oral (FENG, XIAO, *et al.*, 2017). Desta forma faz-se necessário o estudo da SOX3 em melanomas orais caninos para se ter entendimento da atividade desse marcador para com isso termos um comparativo para com os seres humanos.

A SOX10 foi notificada primeiramente através de sua ação sob as células da crista neural induzindo diferenciação celular. Além disso, essa proteína está relacionada com a gênese de diversas neoplasias (GUBBAY, COLLIGNON, *et al.*, 1990; BANNYKH, STOLT, *et al.*, 2006; FLAMMIGER, BESCH, *et al.*, 2009; KWON, HEO, *et al.*, 2016). A superexpressão de SOX10 foi relatada em carcinoma hepatocelular, sendo considerada como oncogene nessa neoplasia (KWON, HEO, *et al.*, 2016). Outros autores relatam essa proteína com um e supressor de tumor em neoplasias do tubo digestivo (WATANABE, BRODERS-BONDON, *et al.*, 2013). E, de maneira distinta, no carcinoma de bexiga é relatado que a SOX10 induz migração, invasão, proliferação e

metástase (BEHRENS, BOOTHE, *et al.*, 2019). No melanoma a SOX10 já tem sido estudada, sendo relatada como um marcador tão sensível quanto Melan A, S100 e HMB45 para o diagnóstico de melanomas, devido sua especificidade e sensibilidade em tecidos neurais e melanócitos (PLAZA, BONNEAU, *et al.*, 2016; PALLA, SU, *et al.*, 2013; ALGHAMDI, ZOROQUIAIN, *et al.*, 2015). Em melanomas cutâneos, a SOX 10 apresentam relação com a via MAPK, em neoplasias BRAF mutados, e o seu silenciamento induz a superexpressão de fator de crescimento epidérmico (EGFR) contribuindo para a resistência quimioterapêutica (CRONIN *et al.*, 2018). Como no melanoma oral a mutação de BRAF é extremamente rara, podemos sugerir que a expressão de SOX10, em melanomas caninos orais, pode estar associado a outras vias associadas a agressividade dessa neoplasia.

Apesar da literatura demonstrar de forma detalhada estudos das proteínas da família SOX na carcinogênese de muitas neoplasias, são necessários estudos mais detalhados sobre as proteínas dessa família em melanomas orais caninos, principalmente determinando sua relação com marcadores prognósticos nesse tipo de lesão.

Estudos prévios sugerem que, em melanomas orais caninos a proliferação está associada com maior agressividade tumoral. Destarte, os resultados da expressão de SOX2, SOX3, SOX10 e a proliferação celular aqui observados podem ajudar no entendimento da oncogênese em cães, podendo fornecer informações relevantes no cenário veterinário quanto a informações prognósticas e preditivas, bem como fomentar dados comparativos importantes para o estudo dessa neoplasia em humanos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1) Objetivo geral**

Caracterizar a expressão da SOX2, SOX3, SOX10 e sua relação com a proliferação celular em melanomas orais caninos.

## **2.2) Objetivos específicos**

- Classificar e descrever os principais aspectos histopatológicos em casos de melanoma oral canino.
- Caracterizar a expressão imuno-histoquímica de SOX2, SOX3 e SOX10 em células neoplásicas de melanoma oral canino.
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica de SOX2, SOX3 e SOX10 com o índice proliferativo, a partir da expressão de Ki67, e com os aspectos histopatológicos compatíveis com agressividade tumoral em amostras de melanomas orais canino.

## **3. METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A metodologia, resultados e discussão serão apresentados em forma de artigo científico que se encontra nas normas do periódico que será submetido.

O artigo encontra-se nas normas do periódico a que será submetido ao *Journal of Veterinary Dentistry*.

#### **4. ARTIGO**

Artigo: **Expressão proteica de SOX2, SOX3, SOX10 e sua relação com a proliferação celular em melanomas caninos orais**

O artigo será submetido *Journal of Veterinary Dentistry*

#### **Expressão proteica de SOX2, SOX3, SOX10 e sua relação com aspectos histológicos e proliferativos em melanomas caninos orais**

Renato F. Costa, Bárbara A. Carvalho, Emerson S. Veloso, Bruna M. Lima, Karen Y. R. Nakagaki, Helen L. Del Puerto, Enio Ferreira.

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](mailto:enioferreira@ufmg.br)

## Resumo

A agressividade do melanoma oral pode estar relacionada à diversas mutações que ocorrem durante o desenvolvimento, tanto em seres humanos quanto na espécie canina. Dentre as diferentes alterações de expressões protéicas observadas nesse tipo neoplásico, é descrita a alteração de proteínas da família SOX. Nesse trabalho, foi avaliada a expressão de SOX2, SOX3 e SOX10 e sua relação com o índice proliferativo e aspectos histológicos indicativos de agressividade em melanomas orais caninos. Foram revisados histologicamente 30 melanomas orais caninos e determinada a expressão de Melan-A, SOX2, SOX3, SOX10, e Ki67 nesses tumores. Todos os tumores apresentaram características histomorfológicas compatíveis com tumores malignos e imunopositividade para Melan-A, confirmando o diagnóstico de neoplasia melanocítica oral maligna. A expressão de SOX2, SOX3 e SOX10 foi observada em 7/30 (23,33%), 20% (6/30) e 23/30 (76,67%) dos casos, respectivamente. Dentre os marcadores analisados, destacou-se a relação entre a maior expressão de SOX3 em tumores com menores índices proliferativos. Além disso, foi observada também uma correlação inversa entre a expressão SOX10 citoplasmática e SOX10 nuclear, sugerindo uma mudança da localização dessa proteína em melanomas orais. Aparentemente, dentre as proteínas da família SOX estudadas, a proteína SOX3 apresenta um importante papel na regulação da proliferação celular em melanomas orais e sugere-se que a proteínas SOX2 e SOX10 são expressas constitutivamente nessas neoplasias, sem um papel determinante para a agressividade. Estudos futuros dessa via de transcrição gênica, podem auxiliar em possíveis determinações prognósticas e preditivas da proteína SOX3 no melanoma canino oral.

Palavras Chaves: Melanoma, Imuno-histoquímica, SOX2, SOX3, SOX10, Proliferação, Cão.

## Introdução

O melanoma oral é uma neoplasia maligna que surge da proliferação desenfreada dos melanócitos, células produtoras de melanina que estão distribuídas ao longo de toda lâmina própria da mucosa oral. O melanoma oral em cães, assim como em humanos, é uma neoplasia bastante rara na cavidade oral e sua etiologia permanece incerta<sup>1,2,3,4</sup>. Apesar de apresentar baixa incidência em seres humanos, 0,073% de todas as neoplasias orais e 0,2% a 8% de todos os melanomas, esse tipo tumoral possui taxa de letalidade alta, devido a sua alta propensão a metástase. Em humanos, cerca de 79% dos pacientes vão a óbito em 5 anos após o diagnóstico<sup>3,5-7</sup>.

Muitos são os modelos de estudos animais para o melanoma oral, comumente vem sido citado o modelo canino. Melanomas nessa espécie compartilham semelhanças às lesões humanas, tais como o comportamento clínico, desenvolvimento espontâneo de tumores, respostas à terapias, características moleculares e histopatológicas<sup>8-11</sup>.

O melanoma oral em cães possui uma incidência alta, comparado aos humanos. Em cães, cerca de 62% dos melanomas podem ser observados na cavidade oral, 1% na cavidade ocular, 27% em pele e 10% podem estar localizados em dígitos<sup>11</sup>. A mortalidade é atribuída ao alto índice metastático, apresentando cerca de 58% a 74% de metastases em linfonodos regionais e 14% à 67% nos pulmões, no momento do diagnóstico<sup>12</sup>. Os cães são geralmente tratados com cirurgia, quimioterapia ou radioterapia combinadas<sup>13</sup>. Além disso, outras formas de tratamento vêm sendo encorajadas. A imunoterapia ganha destaque no tratamento do melanoma devido as características imunológicas que fazem deste tumor uma neoplasia relativamente imunogênica<sup>14,15</sup>.

Mesmo existindo distintas formas de tratamentos e possibilidades de combinações terapêuticas, a efetividade desse tratamento ainda é baixa. Quando melanomas orais são tratados apenas com a extirpação cirúrgica, cerca de 85% à 90% dos tumores apresentam, em um tempo estimado de 5-9 meses, o surgimento de metastases à distância e recorrência local<sup>16-18</sup>.



A agressividade do melanoma oral, está relacionada à diversas mutações envolvidas no seu desenvolvimento. Dentre essas mutações, alterações nos genes NRAS e PTEN são mais frequentemente encontradas<sup>9</sup>. Além disso, melanomas em humanos e em cães compartilham mutações nas vias fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), que podem contribuir para progressão dessa neoplasia<sup>11</sup>. Nesse sentido, sugere-se que outras alterações moleculares podem ser semelhantes entre essas espécies, como a mutação da proteína SOX3, já observada em melanomas humanos. Contudo, sugere-se que a SOX3 não é um marcador prognóstico em melanomas humanos<sup>19</sup>. Assim, a busca pelo esclarecimento da expressão da SOX3 em cães, pode auxiliar na demonstração dos aspectos comparativos entre essas espécies.

A SOX3 é descrita como um oncogene em inúmeras neoplasias humanas, incluindo o osteossarcoma, o carcinoma de esôfago, o glioblastoma, o câncer de ovário e o linfoma de células T<sup>20,24-27</sup>. Nessas diferentes neoplasias, é relatado o seu papel no controle da transição epitelio mesênquima, no aumento de viabilidade celular, invasão, proliferação e migração. Além disso, a sua expressão já foi correlacionada com um pior prognóstico, em pacientes diagnosticados com carcinoma hepatocelular<sup>25-29</sup>. Porém ainda não foi estudado as vias de atuação de SOX3 em amostras de tecido canino.

Além da SOX3, outros membros dessa família já têm sido estudados em tumores. A SOX2, um fator de transcrição pertencente ao subgrupo SOXB1 de genes, juntamente com SOX1 e SOX3, desempenha papel de extrema importância tanto na embriogênese de órgãos sexuais, neurogênese quanto na oncogênese<sup>20-14</sup>. Estudos anteriores mostram que a SOX2 está presente em muitas neoplasias, incluindo carcinoma espinocelular cervical, meduloblastoma, carcinoma pulmonar, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma de ovário, carcinoma espinocelular cutâneo e o melanoma<sup>30</sup>. A expressão de SOX2 em melanomas humanos está diretamente relacionada à tumorigenicidade e autorenovação de células iniciadoras e também de células estaminais de melanoma<sup>31</sup>. A superexpressão de SOX2 pode induzir iniciação, resistência, saída do estado de dormência e metástase<sup>32,33</sup>. Relatos recentes demonstram

que a expressão de SOX2 pode estar presente em 50% dos melanomas, estando relacionada com a invasão neoplásica<sup>34</sup>. Alguns autores inferem que a expressão de SOX2 é dispensável para a formação de metástases e para a melanogênese<sup>35,36</sup>.

Apesar da expressão de SOX2 ser bastante controversa e a proteína SOX3 não ter sido ainda esclarecida, a proteína SOX10, outro membro dessa família de fatores de transcrição, já vem sendo amplamente estudada em melanomas. SOX10 pertence ao subgrupo SOXE juntamente com SOX8 e SOX9, e desempenham diversas atividades em diferentes tipos celulares, incluindo células da glia, oligodendrócito, células do sistema nervoso periférico e sistema nervoso central bem como os melanócitos<sup>37</sup>. A SOX10 está altamente expressa em neoplasias mamárias, carcinoma hepatocelular, tumores adenóides císticos salivares, glioblastoma, glioma<sup>38-40</sup>. No melanoma, a SOX10 é uma proteína bastante expressa em células primárias e metastáticas, podendo promover a formação de nevos e a manutenção de nevos congênitos, migração, invasão, supressão da melanogênese e senescência<sup>41-44</sup>.

Partindo do conhecimento do papel dos fatores de transcrição da família SOX em outros tipos neoplásicos, torna-se necessário o melhor entendimento do seu comportamento em melanomas orais. A avaliação do seu papel poderá fornecer informações prognósticas e preditivas relevantes em estudos de terapia alvo. Devido a sua relação com a agressividade em diferentes tipos tumorais, nós hipotetizamos que proteínas dessa família podem, em melanomas caninos, apresentar um papel semelhante ao observado em neoplasias humanas.

## **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 30 casos de melanomas orais, previamente fixados em formol neutro e tamponado a 10% e armazenados em blocos de parafina, do arquivo do Laboratório do Comportamento Celular do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os materiais foram obtidos entre 2005 e 2019, após excisão cirúrgica de cães atendidos em diferentes clínicas veterinárias de Minas Gerais, Brasil.

### *Avaliação Histopatológica*

Secções histológicas de 4µm dos tecidos incluídos em parafina, corados com a técnica hematoxilina-eosina (HE), foram reexaminados para confirmação do diagnóstico morfológico, de acordo com os critérios estabelecidos para confirmação diagnóstica de melanoma<sup>45</sup>. As seguintes características foram determinadas na avaliação histopatológica: a morfologia das células neoplásicas (fusiformes ou epitelióides), pigmentação das lesões, evidência de invasão vascular (êmbolo neoplásico), invasão perineural, ulceração, desmoplasia e presença de atividade juncional (lentiginosa ou pagetóide).

### *Imuno-histoquímica*

Após a revisão dos casos, secções histológicas de 4µm das amostras selecionadas foram utilizadas na técnica de imuno-histoquímica. Neste procedimento foi empregado o método de imunohistoperoxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado. 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 125°C por 40 minutos (Pascal®), com solução de citrato, pH 6,0 (Dako Cytomation Target RetrievalSolution) 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 realização de bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em solução de H2O2 3% em álcool metílico. Os

reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas e os demais reagentes de 30 minutos, com exceção do cromógeno DAB (DAB substrate system, DakoCytomation), que ficou encubado por 1 minuto. As lâminas foram contra-coradas com Giemsa e Hematoxilina de Harris, para diferenciação da pigmentação melânica em verde. Como controles positivos da reação foram utilizados tecido cerebral canino, para SOX2, SOX3, SOX10, e pele, para Ki67. Os controles negativos foram obtidos por substituição do anticorpo primário pelo soro normal de camundongo, coelho e cabra. Os anticorpos primários, suas fontes e clones e principais reagentes estão representados na tabela 1.

#### *Avaliação da Imuno-histoquímica*

A positividade para Melan-A foi identificada pela presença de marcação citoplasmática de cor amarronzada distinta em células neoplásicas, avaliada por um método semiquantitativo previamente descrito. Foram considerados positivos os casos que apresentaram a marcação citoplasmática em mais que 10% das células neoplásicas<sup>46</sup>.

Para a determinação do índice proliferativo das lesões, pela marcação de Ki67, considerou-se imunomarcagem nuclear em células neoplásicas. Foi realizada a identificação de áreas *hot spots* no tumor, onde foram contadas um total de 500 células neoplásicas por lâmina, marcadas ou não marcadas, em objetiva de 40x (Olympus – BX41). Dentro do total de células contadas, fez-se o cálculo de porcentagem do número de células que apresentavam imunomarcagem, obtendo-se assim, o índice requerido. Nesta análise separou-se melanomas com alto índice proliferativo (25/30) e baixo índice proliferativo (5/30) com o ponto de corte de referência pelo percentual de células imunomarcadas (<19,5 e >19,5)<sup>47</sup>.

A quantificação de SOX2, SOX3 e SOX10, foram analisados em dez campos histológicos aleatórios, em objetiva de 40x (Olympus – BX41).

A porcentagem de marcação de SOX2 em células neoplásicas, foi categorizada de maneira semi-quantitativa, a partir do percentual de células positivas na área tumoral: 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%). A

intensidade da marcação foi considerada visualmente e estratificada da seguinte forma: 0 (negativo), 1 (baixos), 2 (moderados) e 3 (altos) e a pontuação final foi obtida através da multiplicação da porcentagem e o escore de intensidade. Desta forma, para análise estatística a pontuação 0 a 4, 6 a 8, 9 a 12 foram consideradas fracas, moderadas e fortes respectivamente<sup>48</sup>.

A porcentagem de marcação de SOX3 em células neoplásicas, foi categorizada de maneira semi-quantitativa, a partir do percentual de células positivas na área tumoral: 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (11-50%), 3(>50%). A intensidade da marcação foi avaliada de maneira semi-quantitativa e estratificada da seguinte forma: 0 (negativa), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte). Ao final, foi determinado um score de marcação para SOX3, obtida por meio da multiplicação do escore de porcentagem pelo escore de intensidade. Melanomas com escore final acima de 5 foram considerados com baixa expressão de SOX3, acima disso, os tumores foram consideradas de alta expressão de SOX3<sup>49-51</sup>.

A porcentagem de marcação de SOX10 em células neoplásicas, foi categorizada de maneira semiquantitativa, a partir do percentual de células positivas na área tumoral: 1+, 1 a 25%; 2+, 25 a 50%; 3+, 50 a 75% e 4+;  $\geq 75\%$ . Foi analisada a marcação citoplasmática, nuclear e formação de clusters perinucleares<sup>48</sup>.

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

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperaçã o antigênica	Anticorpo secundário	Tempo de incubação
SOX2	Polyclonal	R&D Systems	1:100	Citrato + calor pressurizado	Kit ABC*	16h
SOX3	Polyclonal	ThermoFis her	1:100	EDTA + calor úmido	Anti-Goat**	16h
SOX10	Polyclonal	Abcam	1:100	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink***	16h
Melan-A	A103	Dako	1:100	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink***	16h
Ki67	MIB-1	Dako	1:50	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink***	16h

\* (Avidin-Biotin Complex Staining Kits (ABC Kits); Vector Labs's VECTASTAIN, Burlingame, USA).

\*\* (Goat anti-Rat IgG (H+L) Secondary Antibody, Biotin; ThermoFisher Scientific, Rockford, USA).

\*\*\* (Novolink Polymer Detection Sistem; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK).

### *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. Possíveis correlações foram avaliadas pelo Teste de Spearman ou Pearson. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram  $P \leq 0,05$ .

## **Resultados**

### **Parâmetros histopatológicos**

Em relação ao subtipo histológico, dos 30 casos analisados, 76,67% (23/30) eram melanomas epitelióides, 20% (6/30) eram melanomas mistos e somente um caso, 3,33% (1/30) era melanoma fusiforme. A presença de úlceração foi observada em aproximadamente (90%) dos casos. A atividade juncional, foi observada em 73,33% (22/30) dos tumores, com números similares de alterações do tipo pagetóide e lentiginosa e ocorrência de desmoplasia, 36,67% (11/30) para ambas as alterações. A presença de pigmentação e êmbolos neoplásicos foi observada em 63,33% (19/30) e 46,67% (14/30) dos casos, respectivamente. Não foi observado nenhum tipo de correlação ou associação significativa entre os achados histopatológicos.

### **Avaliação imuno-histoquímica da expressão SOX2, SOX3, SOX10 e Ki67**

A média de expressão de Ki67 nos casos estudados foi  $50,46 \pm 25,31$ , sendo observado um alto índice proliferativo em 86,67% (26/30) dos casos (Figura 1 A e B). Na análise de correlação e média com os achados histopatológicos, foi observada somente uma correlação significativa com a formação de êmbolos ( $p > 0,02$  e  $r = 0,48$ ).

A imunomarcagem da proteína SOX2 foi visualizada no citoplasma e no núcleo de melanócitos neoplásicos, presente em 23,33% (7/30) dos casos estudados. No núcleo, a marcação mostrou-se forte e heterogênea em células tumorais, com uma variação de expressão entre 5 a 20 células por campo de maior aumento (HPF) (Figura 1 C). A marcação citoplasmática apresentou-se homogênea variando de fraca a moderada em melanócitos neoplásicos. A

expressão de SOX2 não apresentou nenhuma correlação estatisticamente significativa com a expressão de SOX3, SOX10, Ki-67 e aspectos histológicos estudados.

A expressão de SOX3 foi detectada no citoplasma das células neoplásicas, podendo ser encontrado também em linfócitos intra e peri-tumorais. Foi observada a expressão de SOX3 em 20% (6/30) dos casos, desses, 16,67% (5/30) apresentaram expressão fraca e 3,35% (1/30) apresentaram expressão moderada (Figura 1 D). Não foi encontrado nenhuma correlação significativa entre a expressão de SOX3 e os aspectos histológicos estudados.

Interessantemente, foi observado em tumores com baixa expressão de SOX3 uma elevada expressão de Ki67 ( $p > 0,0052$ ,  $r = -0,5316$ ). Corroborando com as análises de correlação, melanomas orais com positividade para SOX3, estavam em maior frequência associados à melanomas de elevado índice proliferativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação à proteína SOX10, foi observada imunexpressão citoplasmática fraca a moderada em 73,33% (22/30) dos casos estudados (Figura 1 E), e marcação nuclear em 20% (6/30) dos casos (Figura 1 F). Observou-se uma correlação negativa entre a expressão SOX10 citoplasmática e SOX10 nuclear ( $r = -0,7948$ ,  $p < 0,0001$ ). Por vezes, a presença de clusters perinucleares foi observado, contudo sem correlação com os parâmetros analisados. A expressão de SOX10 não apresentou correlação com as proteínas SOX2, SOX3, SOX10 e Ki67 ou com as características histopatológicas avaliadas neste estudo.

## **Discussão**

No presente estudo observamos que a proteína SOX3 indicou maior relevância como marcador oncogênico nas amostras de melanomas orais caninos avaliados, devido a sua relação com o índice proliferativo nesses tumores. De maneira distinta, as proteínas SOX2 e SOX10, apesar de apresentarem imunomarcação positiva nas amostras de melanoma estudadas, não



demonstraram nenhuma relação estatisticamente significativa com os parâmetros histológicos de agressividade nesse tipo tumoral.

Em resumo podemos destacar que, a baixa expressão de SOX3 apresentou relação inversa com a maior proliferação celular em melanomas caninos. Estudos *in vitro*, com células de glioblastoma, demonstraram que a SOX3 está associada a mudanças nas vias relacionadas à proliferação<sup>20</sup>. Além disso, a presença de SOX3 foi visualizada no citoplasma de células neoplásicas, diferente do que é descrito em células não neoplásicas, onde a imunexpressão dessa proteína é observada também no núcleo da célula, como esperado pela sua ação como fator de transcrição<sup>51</sup>.

Em muitos tipos neoplásicos humanos, como glioblastoma, carcinoma de células escamosas esofágico, câncer de estômago, carcinoma de ovário a expressão de SOX3 tem sido associada a um pior prognóstico<sup>20,23,24,26</sup>. Suas vias de atuação ainda são pouco compreendidas no câncer, contudo já é reconhecido o seu papel na supressão da autofagia e ativação da via Hedgehog em glioblastomas<sup>20</sup>. Além disso é descrito que a SOX3 induz migração e invasão no câncer gástrico, por meio da ativação da metaloproteinase 9<sup>26</sup>. A SOX3 pode ser regulada por diferentes fatores de transcrição, incluindo o ERK, induzindo as células neoplásicas a desempenhar papéis cruciais na progressão tumoral, conduzindo o tumor a um fenótipo mais agressivo<sup>23</sup>. Uma explicação para a correlação entre a expressão de SOX3 e o índice proliferativo, em melanomas caninos orais, pode ser baseado no fato da SOX3 estar associada à regulação do ciclo celular semelhante ao observado em células de osteossarcoma<sup>52</sup>.

A expressão citoplasmática de SOX3 em melanomas caninos orais não havia sido abordado anteriormente na literatura. Nossos dados indicam que o padrão de expressão citoplasmática de SOX3 em melanomas caninos orais é semelhante a outras neoplasias descritas. É sugerida que essa mudança na localização da imunexpressão esteja relacionada a uma maior proliferação e invasão celular, promovendo uma menor taxa de sobrevida e maior chance de recorrência tumoral<sup>24</sup>. Estudos de determinação prognóstica devem ser

realizados para compreender melhor esse comportamento em melanomas caninos orais.

Tem sido sugerido também que, a expressão de SOX3 pode estar relacionada as vias ligadas a diferenciação celular, resposta imune; NF- $\kappa$ B e apoptose, conduzindo tumores com expressão de SOX3 a um pior prognóstico. Além desses eventos, a SOX3 promove supressão da sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP) por meio da inibição de Xvent2 e BMP4 em embriões de *Xenopus*<sup>53</sup>. Em linhagens de células de câncer de mama, sugere-se que a expressão de SOX3 esteja relacionada a transição epitélio-mesênquimal, configurando implicações na biologia tumoral contribuindo para formação metastática. Contudo esse comportamento não é observado para células de melanomas, no modelo *in vitro* A375P<sup>37</sup>.

Diferente do observado para a SOX3, as proteínas SOX2 e SOX10 não demonstraram correlação com os parâmetros em relação ao comportamento proliferativo ou aspectos histopatológicos compatíveis com a agressividade de melanomas orais<sup>45</sup>. A expressão de SOX2 em melanomas caninos orais pode funcionar como supressor ou ativador em outras vias sinalização, semelhante ao observado em estudos *in vitro*<sup>54</sup>. Em carcinomas hepatocelulares, gliomas e câncer colorretal, a SOX2 induz transição epitélio-mesênquimal e invasão<sup>55-58</sup>. Desse modo, sugere-se que estudos envolvendo as vias de transição epitélio-mesênquimal e a invasão em melanomas caninos orais possam estar relacionadas à maior expressão de SOX2 nesse tipo tumoral.

De maneira semelhante à SOX2 e ao oposto da literatura, que demonstra a presença de SOX10<sup>59,60</sup> no núcleo das células, nossos estudos indicaram a presença dessa proteína principalmente no citoplasma, somada a formação de clusters perinucleares nos melanomas estudados. SOX10 é uma proteína expressa homogeneamente no melanoma primário e metastático, e importante para a diferenciação dos melanócitos. Mutações somáticas no SOX10 ocorrem no melanoma em estágio inicial, sendo que SOX10 regula positivamente a expressão de MITF, MET e Nestina no melanoma e responde aos sinais Wnt. Sua localização nuclear é controlada pelo receptor tirosina quinase Tam Tyro3 e sua atividade é modulada pelo fator de transcrição SOX5<sup>61</sup>. A

supereexpressão de SOX10 citoplasmática e perinuclear podem indicar sua forma inativa, mutada ou em interação com outras proteínas, como a nestina, e portanto, desempenhando um papel de maior agressividade tumoral em melanomas caninos orais<sup>62</sup>.

Não observamos nenhuma relação entre o comportamento agressivo de melanomas de acordo com os parâmetros histopatológicos e a mudança na expressão de SOX10. Melanomas que apresentam alto índice proliferativo observa-se alta expressão de MITF, visto que SOX10 regula a via MITF, pode sugerir que a invasão no melanoma oral ocorra devido a baixos níveis de MITF e alta expressão de ZEB1 ou por meio da ativação direta da atividade inibitória de melanoma (MIA) a invasão<sup>63,64</sup>. Portanto, nas amostras utilizadas precisa ser estudadas essas vias de ativação de SOX10 para se investigar uma possível correlação com ativação dessas vias e a proliferação em melanomas orais em cães.

Nosso estudo demonstra evidências da atividade dos fatores de transcrição da família SOX no melanoma oral canino. SOX3 mostrou-se mais relevante neste estudo, demonstrando relação inversa com a proliferação celular. Em relação aos fatores de transcrição SOX2 e SOX10, consideramos necessária a análise de outras vias oncogênicas para a compreensão de suas atividades no melanoma oral. A regulação da SOX tanto em cães quanto em humanos pode envolver a ativação de outras vias além daquelas ligadas a proliferação contribuindo para maior agressividade tumoral deste tipo neoplásico. Contudo, o seu papel prognóstico precisa ser determinado e estudos funcionais podem corroborar com os resultados aqui observados.

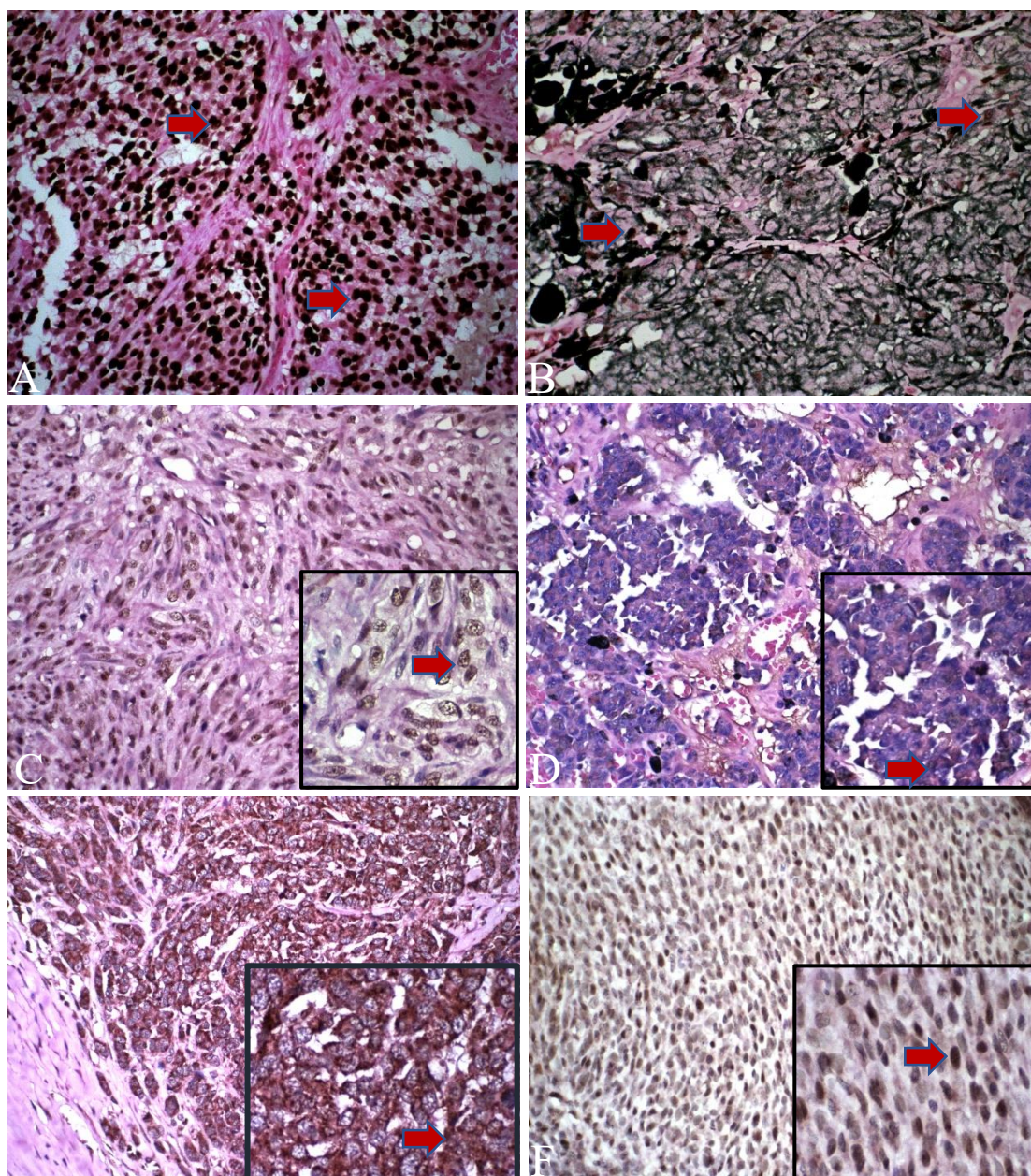


Figura 1: Fotomicrografia de melanoma canino oral, contra-coloração com Giemsa e Hematoxilina 400X e insert de 600x. Imagem A e B. Imunomarcção para Ki67 em células neoplásicas, em A alto índice proliferativo, em B baixo índice proliferativo, marcação nuclear apontado pelas setas. Imagem C, Imunomarcção para SOX2 em células neoplásicas marcação nuclear apontado pelas setas. Imagem D, imunomarcção para SOX3 em células neoplásicas, demonstrando intensidade moderada, marcação citoplasmática. Imagem E, apontado pelas setas. Imunomarcção para SOX10, marcação

citoplasmática. Imagem F. Imunomarcação para SOX10, marcação nuclear, apontado pelas setas.

## REFERÊNCIAS

1. Mısır AF, Durmuşlar MC, Zerener T, Gün BD. Primary malignant melanoma. *Saudi Med J*. 2016;37(4):446-449. doi:10.15537/smj.2016.4.15017
2. Ashok S, Damera S, Ganesh S, Karri R. Oral malignant melanoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020;24:S82-5.
3. Verganti S, Berlato D, Blackwood L, et al. Use of Oncept melanoma vaccine in 69 canine oral malignant melanomas in the UK. *J Small Anim Pract*. 2017;58(1):10-16. doi:10.1111/jsap.12613
4. Nwoga M, Effiom O, Adeyemi B, Soyele O, Okwuosa C. Oral Mucosal Melanoma in Four Nigerian Teaching Hospitals. *Niger J Clin Pract*. 2019;22:1752-1757.
5. Rambhia PH, Stojanov IJ, Arbesman J. No Title Predominance of oral mucosal melanoma in areas of high mechanical stress. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80(4):1133–1135.
6. Symvoulakis EK, Kyrmizakis DE, Drivas EI, et al. Oral mucosal melanoma: a malignant trap. *Head Face Med*. 2006;2(1):1-4. doi:10.1186/1746-160x-2-7
7. Shah H, Zankhana Vyas. Malignant melanoma: A Case report. *J Adv Oral Res*. 2010;1(1):59–62.
8. Van Der Weyden L, Patton EE, Wood GA, et al. Cross-species models of human melanoma. *J Pathol*. 2016;238(2):152-165. doi:10.1002/path.4632
9. Wong K, van der Weyden L, Schott CR, et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-018-08081-1
10. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: What dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2015;370(1673). doi:10.1098/rstb.2014.0231
11. Prouteau A, André C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes (Basel)*. 2019;10(7):501.
12. Bowlt Blacklock KL, Birand Z, Selmic LE, et al. Genome-wide analysis of canine oral malignant melanoma metastasis-associated gene expression.



- Sci Rep.* 2019;9(1):1-14. doi:10.1038/s41598-019-42839-x
13. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, et al. Comparative aspects of canine melanoma. *Vet Sci.* 2016;3(1):1-22. doi:10.3390/vetsci3010007
  14. Hoopes PJ, Wagner RJ, Duval K, et al. Treatment of Canine Oral Melanoma with Nanotechnology-Based Immunotherapy and Radiation. *Mol Pharm.* 2018;15(9):3717-3722. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00126
  15. Hiniker SM, Chen DS, Reddy S, et al. A Systemic complete response of metastatic melanoma to local radiation and immunotherapy. *Transl Oncol.* 2012;5(6):404-407. doi:10.1593/tlo.12280
  16. Proulx DR, Ruslander DM, Dodge RK, et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Vet Radiol Ultrasound.* 2003;44(3):352-359.
  17. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 Cases (1987-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2003;222(9):1234-1236. doi:10.2460/javma.2003.222.1234
  18. Gardner HL, Fenger JM, London CA. Dogs as a model for cancer. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016;4:199-222. doi:10.1146/annurev-animal-022114-110911
  19. SOX3. The Human Protein Atlas. Published 2020. Accessed October 2, 2020. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134595-SOX3/pathology/melanoma>
  20. Marjanovic Vicentic J, Drakulic D, Garcia I, et al. SOX3 can promote the malignant behavior of glioblastoma cells. *Cell Oncol.* 2019;42(1):41-54. doi:10.1007/s13402-018-0405-5
  21. Qiu M, Chen D, Shen C, Shen J, Zhao H, He Y. Sex-determining region Y-box protein 3 induces epithelial-mesenchymal transition in osteosarcoma cells via transcriptional activation of Snail1. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):46. doi:10.1186/s13046-017-0515-3
  22. Kim R, Trubetskoy A, Suzuki T, Jenkins NA, Copeland NG, Lenz J. Genome-Based Identification of Cancer Genes by Proviral Tagging in Mouse Retrovirus-Induced T-Cell Lymphomas. *J Virol.* 2003;77(3):2056-2062. doi:10.1128/jvi.77.3.2056-2062.2003
  23. Yan Q, Wang F, Miao Y, et al. Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. *Tumor Biol.* 2016;37(9):12263-12271. doi:10.1007/s13277-016-5095-x
  24. Li K, Wang RW, Jiang YG, Zou YB, Guo W. Overexpression of Sox3 is associated with diminished prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(3 SUPPL.):13-20. doi:10.1245/s10434-012-2792-6

25. Liu F, Pan Z, Zhang J, et al. Overexpression of RHEB is associated with metastasis and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3838-3845. doi:10.3892/ol.2018.7759
26. Shen J, Zhai J, Wu X, Xie G, Shen L. Serum proteome profiling reveals SOX3 as a candidate prognostic marker for gastric cancer. *J Cell Mol Med.* 2020;24(12):6750-6761. doi:10.1111/jcmm.15326
27. Laronda MM, Jameson JL. Sox3 functions in a cell-autonomous manner to regulate spermatogonial differentiation in mice. *Endocrinology.* 2011;152(4):1606-1615. doi:10.1210/en.2010-1249
28. Alatzoglou KS, Azriyanti A, Rogers N, et al. SOX3 deletion in mouse and human is associated with persistence of the craniopharyngeal canal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):E2702-E2708. doi:10.1210/jc.2014-1160
29. Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 2003;6(11):1162-1168. doi:10.1038/nn1131
30. Wuebben EL, Rizzino A. The dark side of SOX2: Cancer - A comprehensive overview. *Oncotarget.* 2017;8(27):44917-44943. doi:10.18632/oncotarget.16570
31. Santini R, Pietrobono S, Pandolfi S, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Oncogene.* 2014;33(38):4697-4708. doi:10.1038/onc.2014.71
32. Girouard SD, Laga AC, Mihm MC, et al. SOX2 contributes to melanoma cell invasion. *Lab Invest.* 2012;92(3):362-370. doi:10.1038/labinvest.2011.188
33. Jia Q, Yang F, Huang W, et al. Low levels of sox2 are required for melanoma tumor-repopulating cell dormancy. *Theranostics.* 2019;9(2):424-435. doi:10.7150/thno.29698
34. Andreucci E, Pietrobono S, Peppicelli S, et al. SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells. *Cell Commun Signal.* 2018;16(1):1-13. doi:10.1186/s12964-018-0297-z
35. Cesarini V, Guida E, Todaro F, et al. Sox2 is not required for melanomagenesis, melanoma growth and melanoma metastasis in vivo. *Oncogene.* 2017;36(31):4508-4515. doi:10.1038/onc.2017.53
36. Schaefer SM, Segalada C, Cheng PF, et al. Sox2 is dispensable for primary melanoma and metastasis formation. *Oncogene.* 2017;36(31):4516-4524. doi:10.1038/onc.2017.55
37. Cronin JC, Loftus SK, Baxter LL, Swatkoski S, Gucek M, Pavan WJ. Identification and functional analysis of SOX10 phosphorylation sites in melanoma. *PLoS One.* 2018;13(1):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0190834

38. Ivanov S V., Panaccione A, Nonaka D, et al. Diagnostic SOX10 gene signatures in salivary adenoid cystic and breast basal-like carcinomas. *Br J Cancer*. 2013;109(2):444-451. doi:10.1038/bjc.2013.326
39. Serão NV, Delfino KR, Southey BR, Beever JE, Rodriguez-Zas SL. Cell cycle and aging, morphogenesis, and response to stimuli genes are individualized biomarkers of glioblastoma progression and survival. *BMC Med Genomics*. 2011;4(1):49. doi:10.1186/1755-8794-4-49
40. Zhou D, Bai F, Zhang X, et al. SOX10 is a novel oncogene in hepatocellular carcinoma through Wnt/ $\beta$ -catenin/TCF4 cascade. *Tumor Biol*. 2014;35(10):9935-9940. doi:10.1007/s13277-014-1893-1
41. Shakhova O, Zingg D, Schaefer SM, et al. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol*. 2012;14(8):882-889. doi:10.1038/ncb2535
42. Seong I, Min HJ, Lee JH, et al. Sox10 controls migration of B16F10 melanoma cells through multiple regulatory target genes. *PLoS One*. 2012;7(2). doi:10.1371/journal.pone.0031477
43. Cronin JC, Watkins-Chow DE, Incao A, et al. SOX10 ablation arrests cell cycle, induces senescence, and suppresses melanomagenesis. *Cancer Res*. 2013;73(18):5709-5718. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4620
44. Graf SA, Busch C, Bosserhoff AK, Besch R, Berking C. SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2212-2220. doi:10.1038/jid.2014.128
45. Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. *World Heal Organ Int Classif Tumors Domest Anim*. 1998;2:38–41.
46. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: A comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol*. 2011;48(1):54-72. doi:10.1177/0300985810390717
47. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M. Prognostic evaluation of ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol*. 2011;48(1):41-53. doi:10.1177/0300985810388947
48. Wang X, Liang Y, Chen Q, et al. Prognostic significance of SOX2 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Invest*. 2012;30(1):79-85. doi:10.3109/07357907.2011.630049
49. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: A Pan-Schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(9):1291-1298. doi:10.1097/PAS.0b013e3181658c14
50. Guo X, Xiong L, Sun T, et al. Expression features of SOX9 associate with tumor progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2012;7(1):1-7. doi:10.1186/1746-1596-7-44



51. Feng Y, Xiao F, Yang N, et al. Overexpression of Sox3 is associated with promoted tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(7):7873–7881.
52. Guo Y, Yin J, Tang M, Yu X. Downregulation of SOX3 leads to the inhibition of the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells. *Int J Oncol*. 2018;52(4):1277-1284. doi:10.3892/ijo.2018.4278
53. Rogers CD, Harafuji N, Archer T, Cunningham DD, Casey ES. Xenopus Sox3 activates sox2 and geminin and indirectly represses Xvent2 expression to induce neural progenitor formation at the expense of non-neural ectodermal derivatives. *Mech Dev*. 2009;126(1-2):42-55. doi:10.1016/j.mod.2008.10.005
54. Cimadamore F, Shah M, Amador-Arjona A, et al. SOX2 modulates levels of MITF in normal human melanocytes, and melanoma lines in vitro. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(4):533-536. doi:10.1111/j.1755-148X.2012.01012.x
55. Han X, Fang X, Lou X, et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One*. 2012;7(8). doi:10.1371/journal.pone.0041335
56. Sun C, Sun L, Li Y, Kang X, Zhang S, Liu Y. Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Med Oncol*. 2013;30(2). doi:10.1007/s12032-013-0503-1
57. Hüser L, Novak D, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. Targeting SOX2 in anticancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(12):983-991. doi:10.1080/14728222.2018.1538359
58. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, et al. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS One*. 2011;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0026740
59. Willis BC, Johnson G, Wang J, Cohen C. SOX10: A useful marker for identifying metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(2):109-112. doi:10.1097/PAI.0000000000000097
60. Alghamdi SA, Zoroquiain P, Dias ABT, Alhumaid SR, Aldrees S, Burnier MN. Diagnostic value of SOX-10 immunohistochemical staining for the detection of uveal melanoma. *Ecancermedicalscience*. 2015;9:1-6. doi:10.3332/ecancer.2015.566
61. Wegner M. SOX10 (SRY (sex determining region Y)-box 10). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2011;(1):65-67. doi:10.4267/2042/44942
62. Bakos RM, Maier T, Besch R, et al. Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma. *Exp Dermatol*. 2010;19(8):89-94. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.00991.x

63. Tudrej KB, Czepielewska E, Kozłowska-Wojciechowska M. SOX10-MITF pathway activity in melanoma cells. *Arch Med Sci.* 2017;13(6):1493-1503. doi:10.5114/aoms.2016.60655
64. Graf SA, Busch C, Bosserhoff AK, Besch R, Berking C. SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2212-2220. doi:10.1038/jid.2014.128

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Nossos achados permitem concluir que:

- i) Existe uma correlação inversa entre os casos de alta proliferação celular e baixa expressão de SOX3 em melanomas caninos e podendo fornecer informações importantes na compreensão desse modelo de estudo tumoral. Além da mudança de sua localização celular, essa proteína aparentemente está associada a regulação do ciclo celular e conseqüentemente maior agressividade tumoral.
- ii) SOX2 não demonstrou correlação com os parâmetros histopatológicos e proliferação celular.
- iii) SOX10 demonstrou correlação entre a expressão citoplasmática e expressão nuclear.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sabidamente, o melanoma oral representa uma neoplasia de baixa incidência e alta letalidade, devido a seu potencial relativamente alto de invasão e poder metastático, sendo agravado por seu diagnóstico tardio. Ainda que humanos nos dias atuais possuem mais acessibilidade ao cirurgião dentista o diagnóstico do melanoma e outras comorbidades mantem-se tardiamente devido a não cultura de se manter visitas rotineiras ao consultório odontológico. Os cães demonstram quadro parecido aos humanos, sendo mais uma vez o diagnóstico tardio um agravante para o prognóstico para ambas as espécies.

Marcadores preditivos e prognósticos vem sendo cada vez mais bem estabelecidos para se conduzir as terapias antitumorais. A localização, formação de êmbolos neoplásicos características histopatológicas do tumor, bem como a proliferação celular, já são vastamente usadas na oncologia. Porém, melanomas são tumores heterogêneos com baixa resposta terapêutica e astuciosa resistência a terapias convencionais, mostra-se fundamental o estabelecimento de novos parâmetros para estadiamento, tratamento e acompanhamento dessa comorbidade.

A proliferação está ligada diretamente com a progressão tumoral, por ser considerado efeito contrário a apoptose. O índice proliferativo no melanoma mostra-se alto, sendo candidato a possíveis alvos terapêuticos. Outros marcadores como SOX2, SOX3 e SOX10 podem desempenhar papéis prognósticos na terapêutica do melanoma oral. Podemos sugerir que o estudo mais aprofundado do papel da SOX no melanoma oral pode fomentar achados inovadores para controle deste tipo tumoral. Em destaque a SOX3 que mostrou correlação negativa com a proliferação celular neste trabalho.

Portanto, o melanoma oral carece de mais estudos relacionados as proteínas SOX e vias relacionadas a proliferação, afim de elucidarem os mecanismos por trás da expressão dessas moléculas no melanoma oral canino.

## 7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, DM. *et al.* Oral pigmented lesions: a retrospective analysis from Brazil. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal**, v. 761, p. 0–0, 2020.

ALAEDDINI, M.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Immunohistochemical profile of oral mucosal and head and neck cutaneous melanoma. **J Oral Pathol Med**, v. 44, n. 3, p. 234-8, Mar 2015.

ALGHAMDI, S. A. *et al.* Diagnostic value of SOX-10 immunohistochemical staining for the detection of uveal melanoma. **Ecancermedicalsecience**, v. 9, p. 566, Aug 2015.

ALI, Z.; YOUSAF, N.; LARKIN, J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis. **EJC SUPPLEMENTS**, UK, v. 2, n. 11, p. 81–91, Sep 2013.

ALICEA, Gretchen M.; REBECCA, Vito W. Emerging strategies to treat rare and intractable subtypes of melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 34, n. 1, p. 44–58, 2021.

ASCIERTO, P. A. *et al.* Mucosal melanoma of the head and neck. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 112, p. 136-152, Jan 2017.

AVILION, A. A. *et al.* Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Dev**, v. 17, n. 1, p. 126 - 140, 2003.

BANDARCHI, B. *et al.* Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. **J Clin Pathol**, v. 66, n. 8, p. 644–648, 2013.

BANNYKH, S. I. *et al.* Oligodendroglial-specific transcriptional factor SOX10 is ubiquitously expressed in human gliomas. **J Neurooncol**, v. 76, n. 2, p. 115-27, Jan 2006.

BENEVENUTO DE ANDRADE, Bruno Augusto *et al.* Primary nasal mucosal melanoma in Brazil: Clinicopathologic and immunohistochemical study of 12 patients. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 5, p. 344–349, 2012.

BEHRENS, E. L. *et al.* SOX-10 staining in dermal scars. **J Cutan Pathol**, v. 46, n. 8, p. 579-585, Aug 2019.

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.

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, Aug 2014.

BRADFORD, P. T. *et al.* Acral lentiginous melanoma: Incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. **Archives of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 427–434, 2009.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: The immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, Jan 2002.

- BUERY, Rosario Rivera *et al.* NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. **Oncology Reports**, v. 26, n. 4, p. 783–787, 2011.
- BYLUND, M. *et al.* Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. **Nat Genet**, v. 6, n. 11, p. 1162-8, Nov 2003.
- CHOPRA, A.; SHARMA, R.; RAO, U. N. M. Pathology of Melanoma. **Surgical Clinics of North America**, v. 100, n. 1, p. 43-59., Fevereiro 2020.
- COHEN GOLDEMBERG, Daniel *et al.* Epidemiological profile of mucosal melanoma in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2020.
- CRONIN, J. C. *et al.* Identification and functional analysis of SOX10 phosphorylation sites in melanoma. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–18, 2018.
- DITERS, R. W.; WALSH, K. M. Canine Cutaneous Clear Cell Melanomas: A Report of Three Cases. **Vet. Pathol.** , v. 21, n. 3, p. 355-356, 1984.
- DUNCAN, Lyn Mc Divitt. The Classification of Cutaneous Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 3, p. 501–513, 2009.
- EKEDAHL, H. *et al.* The Clinical Significance of BRAF and NRAS Mutations in a Clinic-Based Metastatic Melanoma Cohort. **Br J Dermatol**, v. 169, n. 15, p. 1049-55, 2013.
- FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A. G.; LEMMER, J. A Review of the Aetiopathogenesis and Clinical and Histopathological Features of Oral Mucosal Melanoma. **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 9189812, May 2017.
- FENG, Y. *et al.* Overexpression of Sox3 is associated with promoted tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 10, n. 7, p. 7873–7881, Jul 2017.
- FERRARI, N. M. *et al.* Cutaneous melanoma: Descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 126, n. 1, p. 41–47, 2008.
- FLAMMIGER, A. *et al.* SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 4, p. 945-53, April 2009.

FOWLES, J. S.; DENTON, C. L.; GUSTAFSON, D. L. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. **Vet Comp Oncol**, v. 13, n. 3, p. 288-304, Sep 2015.

FURNEY, S. J. *et al.* Genome sequencing of mucosal melanomas reveals that they are driven by distinct mechanisms from cutaneous melanoma. **Journal of Pathology**, v. 230, n. 3, p. 261–269, 2013.

GILLARD, M. *et al.* Naturally Occurring Melanomas in Dogs as Models for non-UV Pathways of Human Melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 27, n. 1, p. 90-102, Jan 2014.

GIMOTTY, P. A. *et al.* Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 31, p. 8048-56, Nov 2005.

GORSKY, M.; EPSTEIN, J. B. Melanoma Arising From the Mucosal Surfaces of the Head and Neck. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 86, n. 6, p. 715-9, Dec 1998.

GROSS, T.; IHRKE, P.; WALDER, E. Melanocytic tumors. In: *Veterinary Dermatopathology*. St Louis, MO: Mosby, 1992. p. 459-464.

GU, G. M.; EPSTEIN, J. B.; JR, T. H. M. Intraoral Melanoma: Long-Term Follow-Up and Implication for Dental Clinicians. A Case Report and Literature Review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, n. 4, p. 404-13, Oct 2003.

GUBBAY, J. *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 346, p. 245–250, July 1990.

GUBBAY, J. *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 19, n. 346, p. 245-50, July 1990.

GUEVARA-CANALES, J.-O. *et al.* Malignant melanoma of the oral cavity. Review of the literature and experience in a Peruvian Population. **Journal section: Oral Medicine and Pathology**, v. 17, n. 2, p. 206-11, Mar 2012.

HÜSER, L. *et al.* Targeting SOX2 in anticancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 22, n. 12, p. 983 - 991, October 2018.

IGASE, M. *et al.* The oncolytic effects of reovirus in canine solid tumor cell lines. **J Vet Med Sci**, v. 77, n. 5, p. 541–548, May 2015.

KAUNITZ, Genevieve J. *et al.* Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 9, p. 1063–1071, 2017.

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

KVASKOFF, Marina; SISKIND, Victor; GREEN, Adèle C. Risk factors for lentigo maligna melanoma compared with superficial spreading melanoma: A case-control study in Australia. **Archives of Dermatology**, v. 148, n. 2, p. 164–170, 2012.

KWON, A.-Y. *et al.* Sox10 expression in ovarian epithelial tumors is associated with poor overall survival. **Virchows Arch**, v. 468, n. 5, p. 597-605, May 2016.

LEY, R. D. ANIMAL MODELS OF ULTRAVIOLET RADIATION (UVR)-INDUCED CUTANEOUS MELANOMA. **Frontiers in Bioscience**, v. 7, p. 1531-1534, Jun 2002.

LINDE-SIPMAN, J. S. V. D. *et al.* Cutaneous malignant melanomas in 57 cats: identification of (amelanotic) signet-ring and balloon cell types and verification of their origin by immunohistochemistry, electron microscopy, and in situ hybridization. **Vet Pathol**, v. 34, n. 1, p. 31-8, Jan 1997.

LUNA, L. D. *et al.* Feline Non-Ocular Melanoma: A Retrospective Study of 23 Cases (1991–1999). **J Feline Med Surg**, v. 2, n. 4, p. 173-181, December 2000.

MA, X. *et al.* Ki67 Proliferation Index as a Histopathological Predictive and Prognostic Parameter of Oral Mucosal Melanoma in Patients without Distant Metastases. **J Cancer**, v. 8, n. 18, p. 3828–3837, Oct 2017.

MAEKAWA, N. *et al.* Expression of PD-L1 on Canine Tumor Cells and Enhancement of IFN- $\gamma$  Production from Tumor-Infiltrating Cells by PD-L1 Blockade. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e98415, Jun 2014.

- MEIER, F. *et al.* Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. **British Journal of Dermatology**, v. 156, p. 1204–1213, March 2007.
- MELETI, M. *et al.* Oral Malignant Melanoma: A Review of the Literature. **Oral Oncol**, v. 43, n. 2, p. 116-21, Feb 2007.
- MENDENHALL, W. M. *et al.* Head and Neck Mucosal Melanoma. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 6, p. 626–630, Dec 2005.
- MICHEL, J. *et al.* Sinonasal mucosal melanomas: The prognostic value of tumor classifications. **Head Neck**, v. 36, n. 3, p. 311-316, June 2014.
- MILLER, A. J.; MARTIN C. MIHM, J. Melanoma. **The new england journal of medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.
- MOREIRA, R. N. *et al.* Oral and Cutaneous Melanoma: Similarities and Differences. **J Clin Med Res**, v. 2, n. 4, p. 155-158, Aug 2010.
- NASSAR, Kelsey W.; TAN, Aik Choon. The mutational landscape of mucosal melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 61, p. 139–148, abr. 2020.
- NEWELL, Felicity *et al.* Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- NISHIYA, A. T. *et al.* Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Vet Sci**, v. 3, n. 1, p. 7, Feb 2016.
- PALLA, B. *et al.* SOX10 expression distinguishes desmoplastic melanoma from its histologic mimics. **Am J Dermatopathol**, v. 35, n. 5, p. 576-81, July 2013.
- POLLACK, Lori A. *et al.* Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 65, n. 5 SUPPL. 1, p. S78.e1-S78.e10, 2011.
- PATRICK, R. J.; FENSKE, N. A.; MESSINA, J. L. Primary mucosal melanoma. **America Academy of Dermatology**, Florida, v. 5, n. 56, p. 828-834, March 2007.



PATTON, L. R. L. *et al.* Metastatic malignant melanoma of the oral cavity. **ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY**, NORTH CAROLINA, v. 78, n. 1, p. 51-56, July 1994.

PLAZA, J. A. *et al.* Desmoplastic melanoma: an updated immunohistochemical analysis of 40 cases with a proposal for an additional panel of stains for diagnosis. **J Cutan Pathol**, v. 43, n. 4, p. 313-23, April 2016.

POSTOW, M. A.; HAMID, O.; CARVAJAL, R. D. Mucosal Melanoma: Pathogenesis, Clinical Behavior, and Management. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 5, p. 441-448, Outubro 2012.

PROUTEAU, A.; ANDRÉ, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. **Genes (Basel)**, v. 10, n. 7, p. 501, Jun 2019.

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

RAMSAY, J. A. *et al.* MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. **J Invest Dermatol**, v. 105, n. 1, p. 22-6, Jul 1995.

RAPINI, R. P. *et al.* Primary Malignant Melanoma of the Oral Cavity. A Review of 177 Cases. **Cancer**, v. 55, n. 7, p. 1543-51, Apr 1985.

RAVEROT, G. *et al.* Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. **Developmental Biology**, v. 283, n. 1, p. 215-225, July 2005.

RIJN, S. J. V. *et al.* Expression and clinical relevance of paired box protein 7 and sex determining region Y-box 2 in canine corticotroph pituitary adenomas. **Vet J**, v. 204, n. 3, p. 315-21, Jun 2015.

ROBERT, C. *et al.* Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. **The Lancet**, v. 348, n. 9948, p. 1109-1117, September 2014.

SCHADENDORF, D. *et al.* Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. **J Clin Oncol**, v. 33, n. 17, p. 1889–1894, 2015.

SCHAEFER, S. M. *et al.* Sox2 is dispensable for primary melanoma and metastasis formation. **Oncogene**, v. 36, p. 4516–4524, April 2017.

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1673, p. 20140231, April 2015.

SIMPSON, R. M. *et al.* Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 27, n. 1, p. 37–47, Jan 2013.

SMEDLEY, R. C. *et al.* Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, Jan 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, Nov 2002.

SPENCER, K. R.; MEHNERT, J. M. Mucosal Melanoma: Epidemiology, Biology and Treatment. **Melanoma, Cancer Treatment and Research**, Switzerland, v. 167, p. 295-320, Dezembro 2016.

STEVANOVIC, M. *et al.* The cDNA sequence and chromosomal location of the human SOX2 gene. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 640–642, Oct 1994.

TACASTACAS, J. D. *et al.* Update on primary mucosal melanoma. **J Am Acad Dermatol**, v. 2, n. 71, p. 366-75, Aug 2014.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, Aug 2006.

UWANOGHO, D. *et al.* Embryonic expression of the chicken Sox2, Sox3 and Sox11 genes suggests an interactive role in neuronal development. **Mech Dev**, v. 49, n. 1-2, p. 23-36, Jan 1995.

VIKEY, A. K.; VIKEY, D. Primary Malignant Melanoma, of Head and Neck: A Comprehensive Review of Literature. **Oral Oncol**, v. 48, n. 5, p. 399-403, May 2012.

W L SPANGLER, P. H. K. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia. **Vet. Pathol**, v. 43, n. 2, p. 136–149, March 2006.

WATANABE, Y. *et al.* Sox10 and Itgb1 interaction in enteric neural crest cell migration. **Dev Biol**, v. 379, n. 1, p. 92-106, July 2013.

WEGNER, M. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 3, p. 381-390, March 2010.

WEINA, K. *et al.* TGF  $\beta$  induces SOX 2 expression in a time-dependent manner in human melanoma cells. **PIGMENT CELL & MELANOMA Research**, v. 29, n. 4, p. 453–458, April 2016.

WEINA, K.; UTIKAL, J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. **Clinical and Translational Medicine** , v. 3, n. 19, July 2014.

WEINSTEIN, D. *et al.* Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Melanoma. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 7, n. 6, p. 13–24, Jun 2014.

WEYDEN, L. V. D. *et al.* Cross-species models of human melanoma. **Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 152–165, October 2016.

WONG, K. *et al.* Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 353, Jan 2019.


YAN, Q. *et al.* Sex-determining region Y-box3 (SOX3) functions as an oncogene in promoting epithelial ovarian cancer by targeting Src kinase. **Tumour Biol**, v. 37, n. 9, p. 12263-12271, Sep 2016.

YOKOE, I. *et al.* Clinical systemic lupeol administration for canine oral malignant melanoma. **Mol Clin Oncol**, v. 3, n. 1, p. 89-92, Jan 2015.

ZITO, P. M.; MAZZONI, T. Cancer, Oral Melanoma. **StatPearls**, February 2020.

## 8. ANEXOS

### 8.1) Certificado de Aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO/CERTIFICATE**


Certificamos que o Protocolo nº. **008/2016**, relativo ao projeto intitulado “*Expressão gênica e protéica de marcadores prognósticos 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 21/03/2016. Este certificado expira-se em 20/03/2021.

**Aprovada a prorrogação até 20/03/2023 -(reunião de 01/07/2019)**

We hereby certify that the Protocol nº. **008/2016**, 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 03/21/2016. This certificate expires in 03/20/2021.

**New valid date: March 20/2023 – (Approve by CEUA in 07/01/2019)**

Belo Horizonte, 01/07/2019.



Marcelo Resende de Souza  
Coordenador da CEUA/UFMG

Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005, CEP-31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil - Telefone: [3133409-4516](tel:31334094516)  
[www.ufmg.br/biotetic/ceua](http://www.ufmg.br/biotetic/ceua) - [ceua@pppq.ufmg.br](mailto:ceua@pppq.ufmg.br)

## 8.2) Tabela com informações dos casos utilizados

Caso	Diag Vet	Pigment	Desmop	Lentig	Pagetóide	Embolo	Úlceração	Inv. Perineural	Linfonodo	Ki67	SOX3	SOX2	SOX10 Citoplasmática	SOX10 Cluster	SOX10 Nuclear
1	3	1	1	1	0	0	0	0	0	3,8	0	0	-	-	-
2	3	1	1	0	1	1	1	0	0	77,6	0	2	4	2	1
3	3	1	0	1	1	1	1	0	0	53,4	0	0	-	-	-
4	1	0	1	1	0	1	1	0	0	42,6	0	0	4	1	0
5	1	0	1	-	-	1	0	0	0	82,2	0	0	4	3	0
6	3	1	1	0	1	1	1	0	0	32,2	0	8	4	2	0
7	3	2	1	0	1	0	1	1	0	29,8	1	0	-	-	-
8	1	0	1	0	1	1	1	0	0	71,8	0	0	4	1	0
9	1	1	1	0	0	1	1	0	0	55,4	0	0	-	-	-
10	1	1	1	1	1	0	1	0	0	43,2	0	2	4	2	0
11	1	1	1	0	0	1	1	0	1	62	0	4	-	-	-
12	1	2	1	1	1	1	1	0	0	46	0	0	4	2	0
13	1	0	1	1	1	1	1	0	0	77,6	0	3	-	-	-
14	1	0	1	0	0	0	1	0	0	58,6	0	0	4	3	0
15	1	0	1	1	0	1	1	0	0	72,4	0	4	4	3	0
16	1	1	0	1	1	-	1	0	0	18,16	0	0	4	2	1
17	1	1	0	0	0	-	1	0	0	17,21	1	0	4	2	0
18	3	1	0	0	0	0	1	0	0	15,82	1	0	4	1	0
19	1	1	0	1	0	1	1	0	0	34	0	0	4	2	0
20	1	2	0	1	1	0	1	0	0	42	0	0	-	-	-
21	1	0	0	-	-	-	1	0	0	28,5	1	0	2	1	1
22	2	0	0	1	0	0	1	0	0	7,52	1	0	3	4	1
23	1	1	0	-	-	-	-	0	0	20,97	0	2	4	2	0
24	1	0	0	0	-	-	1	0	0	91,7	0	0	4	3	0
25	1	0	0	-	-	-	1	0	0	91,6	0	0	4	1	0
26	1	1	0	0	0	1	1	0	0	55,2	2	0	4	2	0
27	1	0	0	0	0	1	1	0	0	61,67	0	0	4	1	0
28	1	1	0	0	0	0	1	0	0	77	0	0	4	1	0
29	3	1	0	0	0	0	1	0	0	49	0	0	2	3	1
30	1	1	1	1	1	1	1	0	0	27,2	0	0	0	0	4

<sup>1</sup> **Significado dos números e escores imunohistoquímicos.**

Desmoplasia, atividade juncional lentiginosa e pagetóide, presença de êmbolos, úlceras, invasão perineural e metástases em linfonodos, 0 (ausente); 1 (presente). Pigmentação, 0 (ausência de pigmentação); 1 (pouco pigmentado); 2 (moderado); 3 (muito pigmentado). Localização, 0 (cavidade oral). Diagnóstico veterinário, 1 (melanoma epitelíóide); 2 (melanoma misto); 3 (melanoma fusiforme). Escore para expressão de SOX2, 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%). Escore para SOX3, 0 (0%), 1 (1-10%), 2 (11-50%), 3 (>50%). Escore para SOX10, 1+, 1 a 25%; 2+, 25 a 50%; 3+, 50 a 75% e 4+, ≥ 75%.