

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Matheus Vilaro Lóes Moreira

**NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS UVEAIS EM CÃES E GATOS: aspectos  
morfológicos e imuno-histoquímicos**

Belo Horizonte  
2020

Matheus Vilaro Lóes Moreira

**NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS UVEAIS EM CÃES E GATOS: aspectos  
morfológicos e imuno-histoquímicos**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**Área de Concentração:** Patologia Animal  
**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roselene Ecco  
**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ingeborg Maria Langohr

Belo Horizonte  
2020

M838n Moreira, Matheus Vilar do Lóes. 1988 -  
Neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos: aspectos morfológicos e imuno-  
histoquímicos/ Matheus Vilar do Lóes Moreira.2020.  
50 f:il.

Orientadora: Roselene Ecco  
Coorientadora: Ingeborg Maria Langohr

Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais  
Área de concentração: Patologia Animal.  
Inclui bibliografia.

1- Cães – Doenças - Teses - 2 - Tumores em animais - Teses - 3 – Imuno-histoquímica – Teses-  
I – Ecco, Roselene – II – Langohr, Ingeborg Maria – III – Universidade Federal de Minas  
Gerais, Escola de Veterinária – IV – Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

## FOLHA DE APROVAÇÃO

MATHEUS VILARDO LÓES MOREIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Patologia Animal.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

*Roselene Ecco*

Dr.(a). Roselene Ecco  
Presidente - Orientador(a)

*Marina Rios de Araújo Campos*

Dr.(a). Marina Rios de Araújo Campos

*Felipe Pierezan*

Dr.(a). Felipe Pierezan

*Angélica Terezinha Barth Wouters*

Dr.(a). Angélica Terezinha Barth Wouters

*Fabiano Montiani Ferreira*

Dr.(a). Fabiano Montiani Ferreira

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que iluminou o meu caminho nesta jornada me fortalecendo na saúde e na determinação para superar as dificuldades.

Aos meus pais pelas orientações, pelo incentivo, pelas orações e por estarem sempre ao meu lado. A presença de vocês significa a segurança e a certeza de que não estou sozinho na caminhada pela vida.

Ao meu irmão, a minha cunhada e minha sobrinha por participarem da minha vida e torcerem pelo meu êxito.

À Tamara Gabriela Marques de Araújo por me ajudar a tornar esta caminhada mais suave e pelo incentivo constante.

À Universidade Federal de Minas Gerais, seu corpo docente, direção, administração, colegiado de pós-graduação em ciência animal, hospital veterinário e em especial ao setor de patologia animal que oportunizaram a realização deste curso de doutorado com grande capacidade profissional e ética o meu muito obrigado.

A todos os professores por me proporcionarem o conhecimento, além de facilitar a minha aprendizagem e, neste processo, devo destacar a participação e coorientação marcante da professora Ingeborg Maria Langohr que, mesmo à distância, suas opiniões foram de grande importância.

À professora e orientadora Roselene Ecco por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram ao planejamento, a execução e a conclusão desta tese. Por confiar no meu trabalho, me apontar os caminhos da pesquisa e despertar o desejo de continuar trilhando esse caminho. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado com você.

Aos professores Fabiano Montiani Ferreira, Angélica Terezinha Barth Wouters, Felipe Pierezan, Enio Ferreira e Paula Roberta Giaretta, e a doutora Marina Rios de Araújo por aceitarem de imediato fazer parte da banca de tese.

Ao Laboratório do Comportamento Celular do ICB da UFMG, em nome do professor Enio Ferreira e da biomédica MSc. Bárbara Andrade de Carvalho, por todo apoio, dedicação, ensinamento, orientação e paciência na realização de alguns exames de imuno-histoquímica.

A todo o grupo “Ecco Team”, pela amizade e paciência no repasse de conhecimento.

Aos laboratórios de Oftalmologia Comparada da UFPR, de Curitiba/PR, HistoPato, de Brasília/DF e TECSA, de Belo Horizonte/MG, e a médica veterinária MSc. Taismara Simas de Oliveira pelo fornecimento de algumas amostras, que foram de suma importância para a realização deste trabalho.

À Leimar, Valéria e Luís, técnicos do laboratório de patologia animal, pela amizade e carinho de sempre.

Aos amigos pelo apoio e incentivo.

Agradeço a todos que, mesmo não citados, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa de minha vida e que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro, e ninguém é totalmente destituído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

**São Francisco de Assis**

## RESUMO

As lesões mais frequentes envolvendo o bulbo ocular são de natureza neoplásica e as melanocíticas são as mais comuns na úvea dos cães e na íris dos gatos. Podem ser classificadas como melanocitomas (benignas) e melanomas (malignas). Para melhor compreensão do comportamento biológico de neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos, foram utilizadas ferramentas histológicas e imuno-histoquímicas em 32 bulbos oculares, 27 de cães e cinco de gatos. As neoplasias dos bulbos oculares destes animais foram classificadas em benignas (19/27 - cães) ou malignas (8/27 - cães; 5/5 - gatos), e a localização das estruturas oculares envolvidas foi descrita. Determinaram-se, também, os tipos celulares destas neoplasias, os quais foram denominados como epitelioides, fusiformes e mistas, bem como tipos especiais, como de células balonosas, células gigantes multinucleadas e células em anel de sinete. Além disso, foram caracterizadas porcentagem de células com melanina, intensidade de melanina nas células, anisocitose e anisocariose, índice mitótico, presença de inflamação e necrose intratumoral, invasão vascular e desenvolvimento de glaucoma secundário à neoplasia. Para a confirmação da origem melanocítica, foi realizada imuno-histoquímica com os anticorpos anti-PNL2 (29/32) e anti-melan-A (3/3). O índice proliferativo foi verificado, utilizando-se o anticorpo anti-Ki-67, que variou de 2,8 a 12% em melanocitomas de cães, com média de  $6,45 \pm 4,1$  e de 15,8 a 70% em melanomas de cães, com média de  $38,3 \pm 25,21$ . Os melanomas em gatos tiveram variação do índice proliferativo de 10,8 a 30,4%, com média de  $18,96 \pm 7,36$ . Também foi avaliado o índice apoptótico, utilizando o anticorpo anti-caspase-3, que variou de 3,8 a 50% em melanocitomas de cães, com média de  $16,62 \pm 13,26$  e de 30 a 84% em melanomas de cães, com média de  $58,04 \pm 24,25$ . Nos gatos, o índice apoptótico variou de 3,6 a 92%, com média de  $23,16 \pm 38,62$ . A proteína BAP1, cujo padrão de marcação poderia refletir a agressividade tumoral, similar ao relatado para neoplasias oculares melanocíticas em seres humanos, foi também avaliada, e todas as neoplasias uveais do presente estudo foram imunomarcadas. As características histológicas e imuno-histoquímicas encontradas nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos deste estudo ampliaram o conhecimento sobre o uso destas ferramentas como fatores prognósticos; entretanto, recomenda-se mais estudos com acompanhamento da sobrevida do animal após o diagnóstico.

**Palavras-chave:** apoptose, bulbo ocular, imuno-histoquímica, fatores de agressividade tumoral, melanocitoma, melanoma.

## ABSTRACT

The most frequent lesions involving the eye are of neoplastic nature and melanocytic lesions are the most common in the uvea of dogs and in the iris of cats. They can be classified as melanocytomas (benign) and melanomas (malignant). For a better understanding of the biological behavior of uveal melanocytic neoplasms in dogs and cats, histological and immunohistochemical tools were applied to 32 eyes, 27 from dogs and five from cats. The ocular neoplasms of these animals were classified as benign (19/27 - dogs) or malignant (8/27 - dogs; 5/5 - cats), and the location of the involved ocular structures was described. The cell types of these neoplasms were also determined, including epithelioid, spindle and mixed, as well as special types, such as balloon cells, multinucleated giant cells and signet rings cells. In addition, the percentage of cells with melanin, the intensity of melanin within the cells, anisocytosis and anisokaryosis, the mitotic index, the presence of intratumoral inflammation and necrosis, vascular invasion and the development of secondary glaucoma were determined. To confirm the melanocytic origin, immunohistochemistry was performed with anti-PNL2 (29/32) and anti-melan-A (3/3) antibodies. The proliferative index in dogs was verified using the anti-Ki-67 antibody, which varied from 2.8 to 12% in melanocytomas, with an average of  $6.45 \pm 4.1$  and from 15.8 to 70% in melanomas, with an average of  $38.3 \pm 25.21$ . The proliferative index for cats varied from 10.8 to 30.4%, with an average of  $18.96 \pm 7.36$ . The apoptotic index was also evaluated for both species, using the anti-caspase-3 antibody. For dogs, the apoptotic index varied from 3.8 to 50% in melanocytomas, with an average of  $16.62 \pm 13.26$  and from 30 to 84% in melanomas, with an average of  $58.04 \pm 24.25$ . For cats, the apoptotic index ranged from 3.6 to 92%, with an average of  $23.16 \pm 38.62$ . The BAP1 protein, the marking pattern of which might influence tumor aggressiveness as reported for melanocytic ocular neoplasms in humans, was also evaluated in all uveal neoplasms in the present study. The histological and immunohistochemical characteristics found in uveal melanocytic neoplasms in dogs and cats in this study expanded the knowledge about the use of these tools as prognostic factors; however, further studies with animal survival follow-up after diagnosis are recommended.

**Keywords:** apoptosis, eye, immunohistochemistry, tumor aggressiveness factors, melanocytoma, melanoma.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Bulbo ocular normal de cão .....   | 14 |
| Figura 2. Estrutura da proteína BAP1 com genes e proteínas que se ligam a ela .....                          | 21 |
| Figura 3. Macroscopia de bulbos oculares com neoplasia melanocítica uveal em cães e gatos .....              | 28 |
| Figura 4. Morfologia celular das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....                       | 30 |
| Figura 5. Melanocitoma e melanoma em bulbo ocular de cão e gato .....  | 31 |
| Figura 6. Imunomarcção com anti-melan-A em melanoma uveal de cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade ..... | 33 |
| Figura 7. Imunomarcção com anti-PNL2 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....                | 34 |
| Figura 8. Imunomarcção com anti-BAP1 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....                | 35 |
| Figura 9. Imunomarcção com anti-Ki-67 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....               | 37 |
| Figura 10. Imunomarcção com anti-caspase-3 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .              | 38 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Anticorpos primários e protocolos das reações imuno-histoquímicas .....                       | 25 |
| Tabela 2. Localização anatômica das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....               | 27 |
| Tabela 3. Morfologia celular das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....                  | 29 |
| Tabela 4. Caracterização histopatológica das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....      | 32 |
| Tabela 5. Resultados da imunomarcção nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos .....          | 35 |
| Tabela 6. Graduação imuno-histoquímica de PNL2 nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos..... | 36 |
| Tabela 7. Graduação imuno-histoquímica de BAP1 nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos..... | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BARD1 - BRCA1 *Associated RING Domain Protein 1*

BRCA1 - câncer de mama tipo 1 (em inglês, *breast cancer type 1*)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DAB - 3,3'-Diaminobenzidina

DNA - ácido desoxirribonucleico (em inglês, *deoxyribonucleic acid*)

HCF-1 - fator 1 da célula hospedeira (em inglês, *host cell factor-1* HCF-1)

HPF – campo de maior aumento (em inglês, *High Power Field*)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

NLS – sinal de localização nuclear (em inglês, *nuclear localization signal*)

NSE - enolase neuronal específica (em inglês, *specific neuronal enolase*)

PBS - solução salina tamponada com fosfato (em inglês, *phosphate buffered saline*)

pH - Potencial de Hidrogênio

S.R.D. – sem raça definida

UCH – hidrolase terminal de carboidratos ubiquitina (em inglês *ubiquitin carboxyl terminal hydrolases*)

ULD – sítio semelhante ao UCH37 (em inglês, *UCH37-like domain*)

µm – micrômetro

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 12 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 13 |
| 2.1. Neoplasias melanocíticas intraoculares .....  | 13 |
| 2.2. Marcadores imuno-histoquímicos .....  | 16 |
| 2.2.1. Anti-Ki-67 .....  | 16 |
| 2.2.2. Anti-caspase-3 .....  | 16 |
| 2.2.3. Marcados melanocíticos .....  | 17 |
| 2.2.4. Anti-BAP1 .....   | 18 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....  | 21 |
| 3.1. Objetivos gerais .....  | 21 |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 22 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 22 |
| 4.1. Amostras e histopatologia .....   | 22 |
| 4.2. Imuno-histoquímica.....   | 23 |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....   | 26 |
| 5.1. Avaliação morfológica comparativa entre melanocitomas e melanomas em cães e melanomas em gatos .....        | 29 |
| 5.2. Avaliação imuno-histoquímica comparativa entre melanocitomas e melanomas em cães e melanomas em gatos ..... | 33 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....  | 38 |
| <b>7. CONCLUSÕES</b> .....   | 42 |
| <b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   | 42 |
| <b>9. REFERÊNCIAS</b> .....  | 43 |
| <b>10. ANEXO 1</b> .....   | 50 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores melanocíticos são as neoplasias intraoculares mais comuns nos cães (Turner, 2010) e os olhos são a localização mais frequente para a ocorrência da neoplasia melanocítica em gatos (Patnaik e Mooney, 1988; Day e Lucke, 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (Goldschmidt et al., 1998) o termo melanocitoma é designado para neoplasias benignas e melanoma para neoplasias malignas com origem em melanócitos (Smith et al., 2002). As neoplasias melanocíticas uveais podem se desenvolver a partir de melanócitos da íris, do corpo ciliar e da coroide (Hu, 2005). A úvea anterior é o principal sítio de desenvolvimento de neoplasias melanocíticas em animais, sendo o melanocitoma mais frequente em cães e o melanoma difuso de íris em gatos (Dubielzig et al., 2010; Wilcock e Njaa, 2016). O prognóstico é mais favorável quando a neoplasia se restringe a úvea, não havendo infiltração em tecidos adjacentes (Kalishman et al., 1998; Miller, 2008; Wiggans et al., 2016).

O diagnóstico da neoplasia melanocítica uveal é desafiador devido à alta variabilidade morfológica do melanócito, que pode ser facilmente confundido com outras neoplasias oculares. Em melanomas, fatores como as características histológicas das células neoplásicas e a quantificação das mitoses são de extrema relevância prognóstica (Spangler e Kass, 2006; Dubielzig et al., 2010; Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). Para um diagnóstico acurado, é essencial a realização de exames complementares como a imuno-histoquímica (Banerjee e Harris, 2000; Koopmans et al., 2014) e a microscopia eletrônica (Banerjee e Harris, 2000).

Estudos sobre o comportamento biológico das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos são escassos e divergentes. Há estudos que contabilizaram 5% de potencial metastático do melanoma uveal em cães (Wilcock e Njaa, 2016), enquanto outros contabilizaram 33,3% (Wilcock e Peiffer, 1986). Quanto aos gatos, um estudo indicou 19% de potencial metastático para o melanoma difuso da íris (Wiggans et al., 2016).

No Brasil, o estudo de lesões em bulbos oculares de animais ainda é incipiente (Martins e Barros, 2014; Hesse et al., 2015; Moreira et al., 2018), principalmente envolvendo uma neoplasia específica, como as melanocíticas. Os relatos de melanoma ocular em animais não são conclusivos ou totalmente esclarecedores quanto ao potencial metastático (Wilcock e Peiffer, 1986; Wiggans et al., 2016; Wilcock e Njaa, 2016), por isso mais estudos são fundamentais na área. Os resultados da avaliação ocular histopatológica, nos casos de enucleação cirúrgica, podem propiciar um melhor reconhecimento do quadro clínico-patológico e a adoção de conduta terapêutica adequada, auxiliando na prevenção da morte de animais. Sabe-se que as características clínicas, morfológicas e moleculares das neoplasias

melanocíticas em seres humanos são similares às dos cães, sendo esta espécie um ótimo modelo de estudo comparativo (Simpson et al., 2013; van der Weyden et al., 2016; Prouteau e André, 2019).

Pela escassez de estudos sobre o comportamento biológico das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos, este trabalho teve como objetivo avaliar as características morfológicas das células melanocíticas neoplásicas, após a confirmação da origem tumoral por imunohistoquímica com os marcadores anti-PNL2 e anti-melan-A. Avaliou-se, também, os índices proliferativo e apoptótico por imunohistoquímica pelos marcadores anti-Ki-67 e anti-caspase-3, bem como a presença da proteína BAP1, para verificação de supressão tumoral nas neoplasias melanocíticas uveais de cães e gatos.

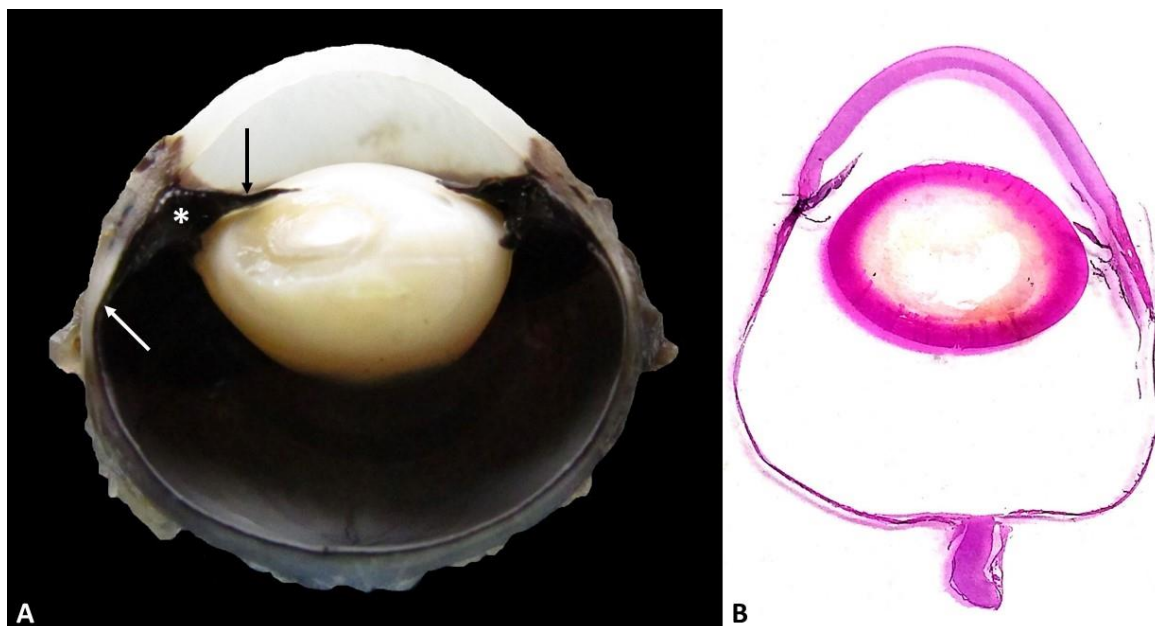
## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Neoplasias melanocíticas intraoculares**

Os melanócitos são um grupo de células maduras derivadas dos melanoblastos, provenientes da crista neural. Sintetizam o pigmento melanina, que fica armazenado em grânulos intracitoplasmáticos denominados melanossomos (Li e Herlyn, 2000; McGeady et al., 2006; Brenner e Hearing, 2009; Cichorek et al., 2013; Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). A melanina tem diversas funções, dentre elas a barreira de radiação solar e a pigmentação da pele, dos pelos, dos cascos e de algumas estruturas oculares (McGeady et al., 2006).

As lesões mais comumente diagnosticadas envolvendo o bulbo ocular são as de natureza neoplásica, atingindo frequência de 39% (Dubielzig et al., 2010). As neoplasias oculares destacam-se na oftalmologia veterinária pela frequência com que ocorrem e consequências aos animais. Tais doenças podem afetar a visão, a aparência e o conforto do animal quando presentes no bulbo ocular, órbita ou anexos e podem ainda ser um sinalizador de neoplasias metastáticas (Miller, 2008).

As neoplasias intraoculares mais comuns em cães são as melanocíticas (Turner, 2010) e os olhos são a localização mais frequente para a ocorrência da neoplasia melanocítica em gatos (Patnaik e Mooney, 1988; Day e Lucke, 1995). As neoplasias melanocíticas presentes na úvea podem ter origem a partir de melanócitos da íris, do corpo ciliar e da coroide (Hu, 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Bulbo ocular normal de cão. **A)** Secção de bulbo ocular com destaque às seguintes estruturas: íris (seta preta), corpo ciliar (\*) e coroide (seta branca). Bulbo ocular fixado com solução de Davidson. **B)** Imagem submacroscópica de bulbo ocular com evidenciação da íris, corpo ciliar e coroide.

Frequentemente, os olhos mais acometidos pelas neoplasias melanocíticas uveais são os intensamente pigmentados e não há predisposição por sexo (Dubielzig et al., 2010). Em um estudo com 1.090 melanocitomas uveais em cães, 94% eram da úvea anterior e 6% da coroide. Por outro lado, em 334 melanomas em cães, 96,7% (323/334) eram restritos à úvea anterior e 3,3% (11/334) à coroide (Dubielzig et al., 2010). No exame oftalmológico, a proporção de neoplasias melanocíticas na úvea posterior pode ser subestimada, pois para diagnosticar as neoplasias na coroide é necessário o exame de fundo de olho, procedimento não rotineiramente executado por clínicos veterinários. Em gatos há o melanoma difuso de íris, que tem uma apresentação clínica comum, em que aparecem áreas pontuais ou multifocais pretas na íris, que progridem com o tempo. Em outro estudo em gatos foram diagnosticados 1.358 casos de melanoma difuso de íris, correspondente a 50% do total de neoplasias nesta espécie encaminhadas ao laboratório de diagnóstico em patologia ocular (Dubielzig et al., 2010).

Geralmente, os tumores melanocíticos uveais em cães têm padrão benigno. Contudo, 15% dos tumores da úvea anterior são malignos e, destes, 5% são considerados potencialmente metastáticos (Wilcock e Njaa, 2016). No entanto, há grande variação na literatura sobre estes dados. Em um estudo de neoplasias melanocíticas oculares primárias em cães, 70,3% (64/91) eram intraoculares, das quais 14,1% (9/64) eram primariamente malignas e 4,7% (3/64) tinham comportamento biológico maligno. Das neoplasias malignas, 33,3% (3/9) apresentaram metástases via hematogênica para outros órgãos em apenas três meses e, em um caso, suspeitou-

se de ocorrência de metástase. Sendo assim, 44,4% dos animais com melanoma intraocular desenvolveram metástases (Wilcock e Peiffer, 1986). Em um estudo de melanoma difuso de íris em felinos, ocorreu ou se suspeitou de metástase em 19% (9/47) dos casos (Wiggans et al., 2016).

O prognóstico é mais favorável se a enucleação ocorrer antes da invasão do melanoma na esclera, podendo ser via artérias ciliares, veias ou nervos e até mesmo pelo nervo óptico (Miller, 2008). Em melanoma difuso de íris em gatos, quando a neoplasia se restringe apenas ao estroma da íris, sem invasão no corpo ciliar, há um tempo de sobrevida maior destes animais (Kalishman et al., 1998). De forma similar, há gatos que não desenvolvem glaucoma secundário ao melanoma difuso de íris (Kalishman et al., 1998). Outro estudo, também com melanoma difuso de íris em gatos, demonstrou que invasão da coroide com extensão à esclera, necrose intratumoral e índice mitótico maior que sete em 10 campos de maior aumento (em inglês, *High Power Field - HPF*) são indicadores de metástase (Wiggans et al., 2016).

Um dos fatores que dificulta o diagnóstico da neoplasia é a alta variabilidade morfológica do melanoma, que pode ser facilmente confundido com outras neoplasias oculares. Para um diagnóstico mais preciso é essencial a realização de exames complementares, como a imunohistoquímica (Banerjee e Harris, 2000; Koopmans et al., 2014) e a microscopia eletrônica (Banerjee e Harris, 2000). Utilizando técnicas moleculares, a identificação de alguns genes de melanomas uveais podem predizer com maior precisão as chances de metástases (Onken et al., 2006). Pode ainda haver associação de técnicas, como a identificação de certas proteínas utilizando marcadores imuno-histoquímicos e moleculares havendo, dessa forma, um prognóstico mais preciso (Koopmans et al., 2014).

Ao exame histopatológico, os melanomas de seres humanos (Banerjee e Harris, 2000) e de cães (Smedley et al., 2011) apresentam variabilidade no tamanho das células, no formato, nas características citoplasmáticas e nucleares e na arquitetura (Banerjee e Harris, 2000; Smedley et al., 2011). Em contrapartida, em cães, o índice mitótico é uma ferramenta importante na compreensão do comportamento e do prognóstico dos melanomas (Miller, 2008; Smedley et al., 2011). A possibilidade metastática baseada no elevado índice mitótico existe; no entanto, há grandes variações nas taxas mitóticas, dificultando o estabelecimento de uma relação mais precisa entre ambos (Miller, 2008).

Morfologicamente, os melanocitomas tendem a ser mais pigmentados, contendo células epitelioides e fusiformes e, geralmente, menos de quatro mitoses por 10 HPF. Os melanomas são geralmente menos pigmentados ou amelanóticos, têm pleomorfismo celular e nuclear intenso e possuem mais de quatro mitoses por 10 HPF (Spangler e Kass, 2006; Dubielzig et al.,



2010; Goldschmidt e Goldschmidt, 2017). As neoplasias que contêm células epitelioides e um padrão de matriz extracelular apresentam pior prognóstico (Koopmans et al., 2014). Contudo, a contagem mitótica pode ser contestada, pois áreas de artefato e de necrose e/ou apoptose podem ser amplas, bem como a intensidade de pigmento de melanina intracitoplasmática, interferindo na quantificação das mitoses.

## **2.2. Marcadores imuno-histoquímicos**

### **2.2.1. Anti-Ki-67**

Como ferramenta complementar para minimizar o erro da quantificação mitótica, pode-se realizar imuno-histoquímica para a marcação do Ki-67. Dessa forma, aumenta-se a sensibilidade na contagem de células em proliferação, que pode chegar ao dobro do número de mitoses encontradas na coloração de rotina para histologia, servindo como indicador prognóstico (Roels et al., 1999; Bergin et al., 2011). O Ki-67 é uma proteína nuclear do tipo não histona que é expressa em todas as fases da divisão celular, com exceção da fase de repouso (Brown e Gatter, 2002). Assim, a marcação pelo Ki-67 em melanomas estabelece a progressão e a agressividade do neoplasma (Weinstein et al., 2014). Portanto, quanto maior o índice mitótico do melanoma uveal, maior a chance de metástases (Angi et al., 2011).

### **2.2.2. Anti-caspase-3**

Outro importante marcador é o anti-caspase-3, que marca uma protease efetora em células em apoptose. A detecção de células apoptóticas é importante, pois, em neoplasias melanocíticas extraoculares, a quantidade de células em apoptose é inversamente proporcional à marcação pelo Ki-67, ou seja, quanto mais agressiva é a neoplasia, menor o índice apoptótico e maior o índice proliferativo (Stauton e Gaffney, 1995; Glinsky et al., 1997). Entretanto, há poucos estudos sobre a apoptose em melanomas em cães (Modiano et al., 1999).

A apoptose pode ocorrer por duas vias principais, extrínseca e intrínseca. A via extrínseca está ligada a receptores de membrana, os quais causam a morte programada da célula. Em contrapartida, a via intrínseca, mais comumente relacionada a processos neoplásicos, está associada principalmente às mitocôndrias. Assim, possíveis causas como a ausência de fatores de crescimento, de hormônios e de citocinas (regulada por sinais negativos) ou a incidência de radiações, quimioterapias, exposição à toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais e radicais livres (regulada por sinais positivos) podem interferir na atividade mitocondrial, levando à liberação de citocromo C (Jiang e Wang, 2000; Soengas e Lowe, 2003; Lavrik et al., 2005;

Elmore, 2007). Estes estímulos causam poros na membrana mitocondrial, consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol celular e formação de apoptossomos, que irão iniciar a cascata de apoptose celular ativando as caspases iniciadoras (Jiang e Wang, 2000; Saelens, 2004; Lavrik et al., 2005; Elmore, 2007).

Existem três grandes grupos de caspases: caspases inflamatórias (grupo I), caspases iniciadoras de apoptose (grupo II) e caspases efetoras (grupo III) (Lavrik et al., 2005). As caspases inflamatórias são essenciais para o sistema imune, maturando as citocinas. As caspases iniciadoras (8 e 9) clivam e ativam pró-formas inativas de caspases efetoras (3, 6 e 7), onde, após a ativação da caspase-9, principalmente, ocorre a clivagem da caspase-3, principal enzima responsável pela fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) celular. As caspases efetoras ativadas clivam enzimas e proteínas essenciais para a viabilidade celular (Soengas e Lowe, 2003; Elmore, 2007).

### **2.2.3. Marcados melanocíticos**

Os melanomas são tipicamente positivos para vimentina, enolase neuronal específica (NSE), proteína S100, HMB-45, melan-A, tirosinase (Banerjee e Harris, 2000) e PNL-2 (Wiggans et al., 2016). Os anticorpos anti-S100, anti-NSE e anti-vimentina são sensíveis para a detecção de melanócitos no melanoma, mas não são específicos e podem marcar outros tipos celulares (Banerjee e Harris, 2000) como, por exemplo, as células que originam o tumor epitelial iridociliar (Dubielzig et al., 1998) e o meningioma (Montoliu et al., 2006). A marcação positiva para melan-A, HMB-45, tirosinase (Verdijk et al., 2011) e PNL2 (Smedley et al., 2011; Wiggans et al., 2016) confirmam a linhagem melanocítica da neoplasia (Smedley et al., 2011; Verdijk et al., 2011; Wiggans et al., 2016). Em seres humanos (Morris et al., 2008) e em cães (Giudice et al., 2010; Ramos-Vara e Miller, 2011), o PNL-2 é mais sensível e específico que o melan-A (Morris et al., 2008; Giudice et al., 2010; Ramos-Vara e Miller, 2011) e o S100 (Morris et al., 2008). Embora o HMB-45 e o melan-A tenham boa especificidade para o melanoma, melanomas metastáticos ou indiferenciados podem apresentar resultados negativos (Banerjee e Harris, 2000).

O PNL2 é um anticorpo monoclonal desenvolvido inicialmente para a detecção de receptores de somatostatina humana. Sabe-se que a sua expressão ocorre no citoplasma de células melanocíticas, mas seu alvo permanece desconhecido (Aung et al., 2012). A marcação pelo PNL2 ocorre mesmo após o clareamento e/ou descalcificação do tecido (Rochaix et al., 2003) com ácido fórmico (Ramos-Vara e Miller, 2011). Este estudo também demonstrou que a imunomarcação para PNL2 não foi comprometida pelo tempo de fixação em formalina, em um

prazo máximo de 10 semanas (Ramos-Vara e Miller, 2011). Um estudo demonstrou que a maior intensidade e a homogeneidade de imunomarcção pelo PNL2 de células melanocíticas neoplásicas está associada à menor taxa de metástase em melanoma difuso de íris em gatos (Wiggans et al., 2016).

A proteína melan-A é um antígeno de diferenciação melanocítica, produto do gene MART-1 (Chen et al., 1996). A melan-A tem expressão citoplasmática e é considerada excelente antígeno para imunomarcção no diagnóstico de melanomas uveais atípicos (Fernandes et al., 2007). Um estudo demonstrou que a imunomarcção do melan-A foi levemente comprometida pelo tempo de fixação em formalina, a partir de quatro semanas (Ramos-Vara e Miller, 2011). Em um estudo em que compararam a imunomarcção de anti-melan-A, anti-PNL2 e anti-tirosinase, os autores concluíram que o anti-PNL2 é o anticorpo mais confiável no diagnóstico de neoplasias melanocíticas em cães e parece ter 100% de especificidade com células melanocíticas (Ramos-Vara e Miller, 2011). Em outro estudo foi afirmado que o anti-PNL2 tem melhor marcação que o anti-melan-A em neoplasias melanocíticas caninas (Giudice et al., 2010). A associação do anti-PNL2 com anti-melan-A e a associação de anti-PNL2, anti-melan-A e anti-tirosinase fornecem uma sensibilidade de 95% e 98% para neoplasias melanocíticas em cães, respectivamente (Ramos-Vara e Miller, 2011). Além disso, a associação de anti-PNL2, anti-melan-A e anti-tirosinase fornece alta sensibilidade em neoplasias amelanóticas (Smedley et al., 2011).

#### **2.2.4. Anti-BAP1**

Diversas células do organismo precisam realizar uma modificação pós-traducional de proteínas com ubiquitina, sendo um mecanismo reversivo e crucial no processo celular (Machida et al., 2009). Inicialmente, as proteínas que realizam a ubiquitinação tinham um papel apenas de sinalizar as proteínas que seriam degradadas; entretanto, com o avanço dos estudos, percebeu-se que essas proteínas têm função muito além no mecanismo de regulação do processo celular, como reparo do DNA, transcrição de genes, deslocamento através da membrana celular, progressão do ciclo celular, resposta a estresse, comunicação celular, diferenciação, apoptose e um papel no desenvolvimento de neoplasias (Jensen et al., 1998; Bheda et al., 2009; Machida et al., 2009; Misaghi et al., 2009; Yu et al., 2010). Uma das proteínas que realizam o processo de ubiquitinação é a proteína 1 associada ao *BRCA1* (em inglês, *breast cancer type 1*) (BAP1) (Jensen et al., 1998; Machida et al., 2009). A BAP1 tem um importante papel na regulação da expressão de genes (Carbone et al., 2013), inibindo o crescimento tumoral; função esta que já foi descrita *in vitro* (Jensen et al., 1998) e *in vivo* (Ventii et al., 2008).

A BAP1 é uma deubiquitinase nuclear localizada no cromossomo 3p21, que possui dois sinais de localização nuclear (em inglês, *nuclear localization signal* – NLS 1 e 2), e tem função de supressão tumoral (Jensen et al., 1998; Ventii et al., 2008; Machida et al., 2009; Harbour et al., 2010; Njauw et al., 2012; Carbone et al., 2013; Koopmans et al., 2014). A BAP1 codifica a produção da enzima hidrolase terminal de carboidratos ubiquitina (em inglês, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases* – UCH) que catalisa a remoção de substratos proteicos (Jensen et al., 1998).

As duas principais funções da BAP1 são a regulação do ciclo celular normal e a prevenção da proliferação celular descontrolada (Machida et al., 2009), ou seja, função de supressão tumoral (Jensen et al., 1998; Harbour et al., 2010; Abdel-Rahman et al., 2011; Njauw et al., 2012; Carbone et al., 2013; Koopmans et al., 2014) controlando o crescimento do gene *BRCA1* (Jensen et al., 1998).

Em 2008, alguns autores relataram que o *BRCA1* não é um substrato relevante para a gênese tumoral mediante o BAP1 (Ventii et al., 2008). Entretanto, logo após, em 2009, outros autores afirmaram que a BAP1 contribui para o papel da BRCA1/BARD1 (em inglês, *BRCA1 Associated RING Domain 1*) na fase S (Nishikawa et al., 2009), onde a BRCA1 se liga a um sítio semelhante ao UCH37 (em inglês, *UCH37-like domain* – ULD) e a BARD1 se liga na UCH (Misaghi et al., 2009), formando um complexo heterodimérico de supressão tumoral (Nishikawa et al., 2009). Este complexo possui a ubiquitina ligase E3, que regula as respostas de dano ao DNA (Greenberg et al., 2006). Logo, a BAP1 se liga à BARD1 para a deubiquitinação pela modulação da ubiquitina ligase E3 do complexo BRCA1-BARD1 (Nishikawa et al., 2009) (Figura 2).

Portanto, a BAP1 é classificada como uma proteína deubiquitinante que codifica a produção da enzima UCH que catalisa a remoção de substratos proteicos (Jensen et al., 1998). A perda ou a má localização da expressão proteica da BAP1 pode gerar desregulação dos processos celulares, resultando em proliferação tumoral (Machida et al., 2009; Misaghi et al., 2009; Yu et al., 2010). Ou seja, as mutações na UCH e NLS (principalmente NLS2) da BAP1 resultam na alteração de sua atividade deubiquitinante (diminuindo sua ação) e da sua localização nuclear, gerando a formação neoplásica (Ventii et al., 2008).

O fator 1 da célula hospedeira (em inglês, *host cell factor-1* – HCF-1) é uma proteína heterodímera (HCF-1N e HCF-1C) ligada diretamente a cromatina e a BAP1. Sua função é de regulação do ciclo celular (Machida et al., 2009), atuando na proliferação celular na progressão da fase G1 (HCF-1N) e na citocinese (HCF-1C) (Goto et al., 1997; Julien e Herr, 2003) (Figura 2). Portanto, a HCF-1N é ubiquitinada pela BAP1 e a taxa de ubiquitinação é regulada pela

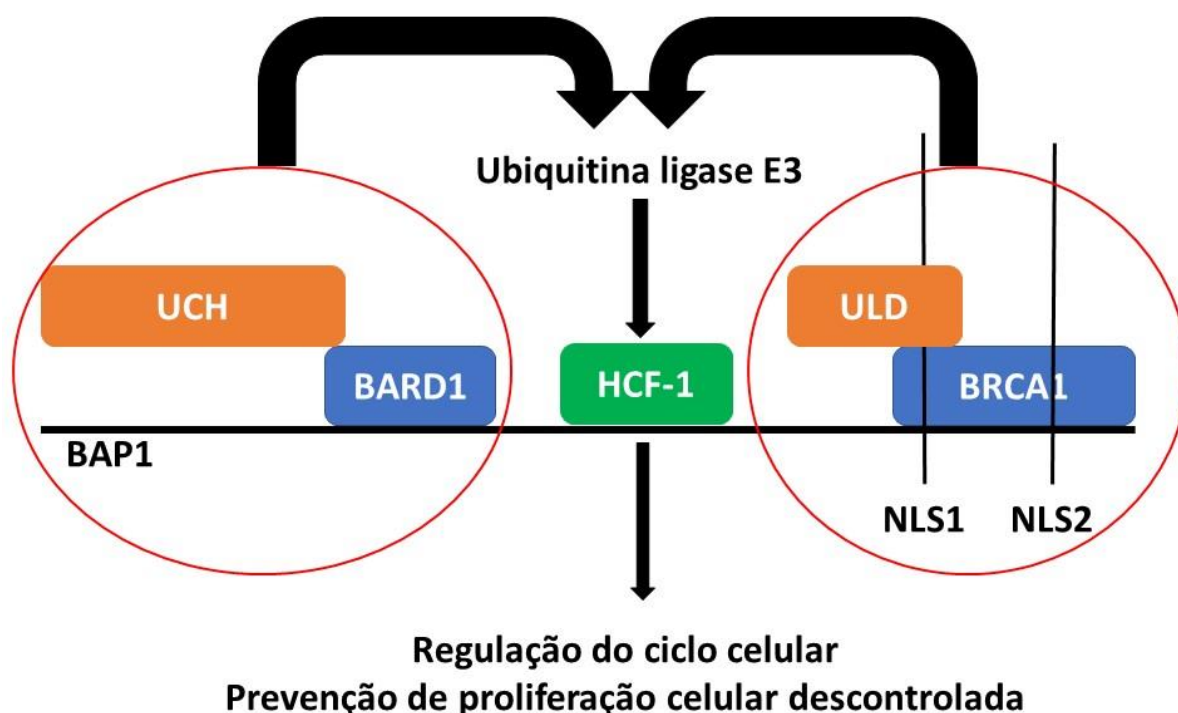
própria BAP1, em que normalmente a BAP1 diminui os níveis de ubiquitinação da HCF-1 (Machida et al., 2009). A interação entre HCF-1 e BAP1 é importante para manter o adequado crescimento celular, atuando na transição G1/S do ciclo celular (Machida et al., 2009), suprimindo o crescimento descontrolado das células, acumulando danos ao DNA, com consequente morte celular (Ventii et al., 2008). Logo, as células que têm pouca BAP1 mostram progressão retardada da transição G1/S do ciclo celular (Nishikawa et al., 2009).

Em seres humanos, a mutação da BAP1 já foi descrita de forma hereditária e somática (Wiesner et al., 2011; Murali et al., 2013), ambas já relatadas em melanomas uveais (Harbour et al., 2010; Njauw et al., 2012; Koopmans et al., 2014), sendo mais frequente nos metastáticos (Njauw et al., 2012; Kalirai et al., 2014). Sabe-se que a monossomia do cromossomo 3 com a mutação somática da BAP1 é a alteração mais comum em melanomas uveais de seres humanos (Harbour et al., 2010); no entanto, o mecanismo envolvido ainda é desconhecido (Harbour et al., 2010; Njauw et al., 2012; Koopmans et al., 2014). Sugere-se que a BAP1 está ligada a uma via neoplásica restrita em melanócitos (Njauw et al., 2012), que atua como um supressor tumoral (Shah et al., 2013) e que mutações deste gene têm influência no crescimento da célula tumoral (Carbone et al., 2013).

As mutações da BAP1 ocorrem em um desenvolvimento mais avançado do melanoma uveal, que geralmente coincide com metástases (Harbour et al., 2010). Neoplasias melanocíticas em seres humanos apresentam diminuição da imunomarcagem nuclear para BAP1 (Wiesner et al., 2011), e melanomas que têm imunomarcagem negativa para BAP1 apresentam um pior prognóstico em relação aos positivos (Shah et al., 2013). Foram determinados três tipos de imunomarcagem do anti-BAP1: difusa, heterogênea e ausente, onde a ausente tem o pior prognóstico. Pacientes humanos que expressam a BAP1 mutante e são negativos na imunohistoquímica da proteína BAP1 têm 7,7 vezes mais chances de desenvolverem metástases (Shah et al., 2013). A não marcação da BAP1 associada à presença de células epitelioides provavelmente está envolvida na patogênese do melanoma uveal mais agressivo (Koopmans et al., 2014). Portanto, a mutação ou a deleção do gene *BAP1* aumenta o risco da ocorrência de metástases de melanoma ocular (Harbour et al., 2010).

A mutação da BAP1 de forma hereditária já foi relatada em diversas neoplasias, como melanoma uveal e cutâneo, adenocarcinoma pulmonar, meningioma, carcinoma neuroendócrino (Abdel-Rahman et al., 2011b), dentre outras. De maneira somática, a mutação já foi relatada em melanoma uveal e cutâneo (Wiesner et al., 2011), carcinomas de ovário, cólon/reto, mamário, pulmonar (Cosmic, 2018), dentre outras. Também já foi relatada em outras neoplasias, como mesotelioma maligno, tumores melanocíticos intradermais atípicos

BAP1 mutados (em inglês, *Melanocytic BAP1-mutated Atypical Intradermal Tumors - MBAITs*), neoplasia renal (Carbone et al., 2012), mamária (Jensen et al., 1998) e pulmonar (Jensen et al., 1998; Carbone et al., 2012). Estas neoplasias com mutação da BAP1 foram relatadas apenas em seres humanos.



**Figura 2.** Estrutura da proteína BAP1 com genes e proteínas que se ligam a ela. Complexo BARD1-UCH e BRCA1-ULD juntamente com a ubiquitina ligase E3 modulam a ubiquitinação da HCF-1.

UCH (em inglês, *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases*), BARD1 (em inglês, *BRCA1-associated RING domain protein 1*), HCF-1 (em inglês, *host cell factor-1*), BRCA1 (em inglês, *breast cancer type 1*), ULD (em inglês, *UCH37-like domain*), NLS1 e NLS2 (em inglês, *nuclear localization signal 1 e 2*).

Adaptado de Harbour et al. (2010).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos gerais

Utilizar os padrões histológicos e as características imuno-histoquímicas, com os marcadores anti-PNL2, anti-melan-A, anti-Ki-67, anti-caspase-3 e anti-BAP1, para avaliação das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

### **3.2. Objetivos específicos**

Caracterizar histologicamente as neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

Avaliar e relacionar a marcação imuno-histoquímica de melan-A e PNL2 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

Avaliar e relacionar a marcação imuno-histoquímica de Ki-67, caspase-3 e BAP1 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

Padronizar a técnica de imuno-histoquímica para os anticorpos anti-caspase-3 e anti-BAP1 para neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

Comparar a marcação imuno-histoquímica de Ki-67, caspase-3 e BAP1 com características histopatológicas como a morfologia das células neoplásicas, inflamação e necrose intratumoral e glaucoma secundário ao tumor.

Comparar as marcações de melan-A, de PNL2, de Ki-67 e de caspase-3 para o diagnóstico e verificar possível associação com o comportamento biológico das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

Avaliar se há perda de marcação da BAP1 para associar ou não com o comportamento biológico das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostras e histopatologia**

O estudo retrospectivo e prospectivo compreendeu o período de julho de 2014 a julho de 2019. Foram coletados 32 bulbos oculares com neoplasia melanocítica uveal de cães e gatos submetidos a enucleação. As amostras recebidas foram provenientes de hospitais veterinários e laboratórios privados veterinários de Belo Horizonte-MG e Brasília-DF, bem como instituições parceiras, como a Universidade Federal do Paraná. O estudo teve o consentimento da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo 262/2014 (Anexo 1). Após a remoção, o bulbo ocular foi fixado em formalina a 10% tamponada neutra para posterior clivagem e processamento rotineiro com desidratação em séries crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. Em seguida foi cortado em micrótomo com 4 µm de espessura e o corte colocado em lâmina de vidro, corado pela técnica rotineira de hematoxilina e eosina e examinado em microscopia óptica convencional (Luna, 1968).

Utilizando a histopatologia, a presença de melanócitos neoplásicos em qualquer estrutura intraocular foi registrada (íris, corpo ciliar, malha trabecular, coróide, esclera, córnea e em vasos, bem como em locais concomitantes).

A morfologia geral das células neoplásicas foi classificada como epitelióide (citoplasmas grandes e vítreos, núcleos grandes com um ou mais nucléolos proeminentes), fusiforme (células fusiformes bipolares em tamanhos e direções variadas, se assemelhando a sarcomas, núcleos ovais a alongados com nucléolos pouco proeminentes) ou mista (quando há os dois componentes celulares, com o mínimo de 10% de qualquer tipo celular) (Kircher et al., 1974; Edge & American Joint Committee on Cancer, 2010). Além disso, a presença ou a ausência de células neoplásicas com morfologia balonosa (células com citoplasma abundante, pálido a limpo ou vacuolizado com densidade variável de melanina, e núcleos geralmente periféricos, com nucléolo único, central e nem sempre visíveis), células em anel de sinete (células ovais, com citoplasma amplo, claro e levemente eosinofílico com o núcleo deslocado para periferia e em formato crescente) (Cangul et al., 2001) e células gigantes multinucleadas também foram registradas.

As células neoplásicas foram quantificadas para porcentagem de células neoplásicas contendo melanina (0%, 1-25%, 26-50%, 51-75% e 76-100%), em que a ausência de melanina (0%) foi usada para as neoplasias amelanóticas. Além disso, foram graduadas para anisocitose, anisocariose e grau de intensidade de pigmento intracelular (nenhum - 0%; mínimo - 1-25%; leve - 26-50%; moderado - 51-75%; e acentuado - 76-100%), semelhante ao realizado por Wiggins et al. (2016). O índice mitótico foi definido como o número de figuras mitóticas observadas em 10 HPF (400x) consecutivos e sem sobreposição, iniciando a contagem em um campo com maior índice mitótico (Nikon® E200, ocular 10x/20).

Além disso, foram avaliadas e registradas lesões associadas ou secundárias à neoplasia, como a presença ou ausência de inflamação linfocitária e necrose intratumoral, ambas classificadas em nenhuma (0%), mínima (1-25%), leve (26-50%), moderada (51-75%) e acentuada (76-100%). Além disso, foi avaliado o desenvolvimento de glaucoma secundário ao neoplasma, como sugerido por Wiggins et al. (2016), bem como qualquer outra alteração ocular. O glaucoma foi avaliado a partir de lesões retinianas, considerado presente quando havia necrose e perda de células ganglionares e picnose de células individuais da camada nuclear interna, bem como o aumento da escavação do disco óptico, quando visível.

#### **4.2. Imuno-histoquímica**

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, os olhos emblocados em parafina foram cortados no micrótomo com 4 µm de espessura e colocados em lâmina silanizada (Triethoxysilane, Aldrich®). Para a confirmação diagnóstica das neoplasias melanocíticas foi utilizado o anticorpo anti-PNL2 e, quando negativo, o anti-melan-A; para a avaliação da



supressão tumoral o anticorpo anti-BAP1; para a análise do índice proliferativo o anticorpo anti-Ki-67; e para a análise do índice apoptótico o anticorpo anti-caspase-3 (Tabela 1).

Inicialmente, as lâminas foram desparafinizadas colocando-as em estufa a 60°C por 10 minutos e, em seguida, dois banhos de 15 e 10 minutos em xilol, respectivamente. Logo após, os tecidos foram hidratados em banhos decrescentes de concentrações de álcool (100%, 100%, 90%, 80% e 70%), por 5 minutos em cada, finalizando a hidratação em água destilada por 10 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido (panela *steamer* a 96°C por 1 hora) ou por calor úmido pressurizado (Pascal® a 125°C por 40 minutos), com solução de citrato pH 6,0 e, posteriormente, resfriado em temperatura ambiente por 30 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizada solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em solução salina tamponada com fosfato (em inglês, *phosphate buffered saline*-PBS) e o bloqueio das proteínas endógenas foi realizado com leite em pó desnatado Molico, Nestlé®, ambos incubados por 30 minutos em estufa a 37°C. Os anticorpos primários anti-PNL2, anti-melan-A, anti-BAP1 e anti-Ki-67 foram instilados, com as respectivas diluições descritas na tabela 1, e incubados por 16 horas (*overnight*) a 4°C, já o anti-caspase-3 teve incubação por uma hora em temperatura ambiente. A amplificação da reação foi realizada utilizando o sistema comercial EnVision™ Flex/HRP (K8000, DAKO®), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. A revelação foi realizada pelo cromógeno 3.3'-diaminobenzidina (DAB) (DAKO®), por 10 minutos, como recomendado pelo fabricante. Logo após, os tecidos foram contracolorados com Giemsa por 40 minutos, conforme Stefanović et al. (2013) e Ravishankar et al. (2016), com modificações, e com banho rápido em hematoxilina. Posteriormente, os tecidos foram desidratados em um banho rápido de álcool absoluto, três minutos em outro álcool absoluto e imersos em dois banhos de xilol por três minutos cada, para então serem montadas com lamínula e Bálsamo do Canadá sintético (Synth®).

A contracoloração com Giemsa foi realizada com o intuito de corar a melanina em verde, conforme descrito por Stefanović et al. (2013) e Ravishankar et al. (2016), com modificações, diferenciando assim da coloração marrom que o DAB fornece.

Como controle positivo para o PNL2 e melan-A foram utilizados melanoma oral de cão sabidamente positivo e os melanócitos da úvea (controle interno) (Wiggans et al., 2016); para o Ki-67 foi utilizado um melanoma oral canino com alto índice proliferativo celular; para a BAP1 foram utilizados o fígado e o epitélio pigmentar da retina, quando visível (controle interno) (Koopmans et al., 2014); e para a caspase-3 foi utilizado timo murino em involução. Como controle negativo os anticorpos primários foram substituídos por PBS (Fernandes et al., 2007).

**Tabela 1.** Anticorpos primários e protocolos das reações imuno-histoquímicas.

| Anticorpo             | Fabricante                | Clone | Diluição | Recuperação antigênica                      | Tempo de incubação | Sistema de detecção                             | Revelação                | Contracoloração       |
|-----------------------|---------------------------|-------|----------|---|--------------------|---|--------------------------|-----------------------|
| PNL2 (sc-59306)       | Santa Cruz Biotechnology® | PNL2  | 1:50     | Citrato (pH 6,0) + calor úmido              | 16 horas           | EnVision™ Flex/HRP (K8000, K8002, K8023, DAKO®) | DAB* (DAKO® ref ACB8030) | Giemsa + hematoxilina |
| Melan-A (IS633)       | DAKO®                     | A103  | 1:100    | Citrato (pH 6,0) + calor úmido pressurizado | 16 horas           | EnVision™ Flex/HRP (K8000, K8002, K8023, DAKO®) | DAB* (DAKO® ref ACB8030) | Giemsa + hematoxilina |
| BAP1 (sc-28383)       | Santa Cruz Biotechnology® | C-4   | 1:50     | Citrato (pH 6,0) + calor úmido              | 16 horas           | EnVision™ Flex/HRP (K8000, K8002, K8023, DAKO®) | DAB* (DAKO® ref ACB8030) | Giemsa + hematoxilina |
| Ki-67 (M7240)         | DAKO®                     | MIB-1 | 1:50     | Citrato (pH 6,0) + calor úmido pressurizado | 16 horas           | EnVision™ Flex/HRP (K8000, K8002, K8023, DAKO®) | DAB* (DAKO® ref ACB8030) | Giemsa                |
| Caspase-3 (RB-1197-P) | NeoMarkers®               | CPP32 | 1:100    | Citrato (pH 6,0) + calor úmido pressurizado | 1 hora             | EnVision™ Flex/HRP (K8000, K8002, K8023, DAKO®) | DAB* (DAKO® ref ACB8030) | Giemsa + hematoxilina |

\*DAB: 3.3'-Diaminobenzidina

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 40x (Nikon® - E200, ocular 10x/20 mm).

A localização da marcação foi definida e registrada. As células neoplásicas foram graduadas em porcentagem de células marcadas para PNL2 (0-9%, 10-25%, 26-50%, 51-75, 76-100%, que corresponde a ausente, mínima, leve, moderada e acentuada, respectivamente), conforme Wiggins et al. (2016). A positividade para PNL2 e melan-A foram identificadas pela coloração marrom no citoplasma das células neoplásicas, sendo considerados positivos os casos com no mínimo 10% de células marcadas, como descrito previamente (Smedley et al., 2011).

Para BAP1, a imunomarcação foi classificada em difusa (>90%), multifocal (10-90%) e ausente (<10%), conforme Shah et al. (2013), com modificações. A positividade para BAP1 também foi identificada pela coloração marrom predominantemente citoplasmática e ocasionalmente nuclear.

Para a determinação do índice proliferativo utilizando Ki-67 e para o índice apoptótico utilizando caspase-3, foi identificada a marcação marrom no núcleo e no citoplasma celular, respectivamente. Para ambas as marcações (Ki-67 e caspase-3), foram selecionadas áreas com maior quantidade de marcação (*hotspots*) e realizou-se a contagem de células marcadas em um total de 500 células neoplásicas, o que gerou a porcentagem e o índice proliferativo e de apoptose, respectivamente.

Considerou-se a possibilidade de acompanhamento dos animais a partir da coleta do bulbo ocular até o final do período de estudo para verificar possíveis metástases. Entretanto, as tentativas de contato com os proprietários e médicos veterinários responsáveis por cada animal não resultaram em informações válidas (por ex., morte do animal sem exames por imagem ou exames *post mortem*) ou não se obteve retorno dos proprietários ou médicos veterinários.

## 5. RESULTADOS

De 32 bulbos oculares com neoplasias melanocíticas analisados, 27 eram de cães e cinco de gatos. Desses 27 olhos de cães, 19 (19/27 – 70,37%) eram melanocitomas e oito eram melanomas (8/27 – 29,63%). Os cães com melanocitoma eram sem raça definida (S.R.D.) (5/19), Pastor Alemão (2/9), Basset Hound (1/19), Boxer (1/19), Bulldog (1/19), Dachshund (1/19), Labrador (1/19), Lhasa Apso (1/19), Pinscher (1/19), Rottweiler (1/19), Schnauzer (1/19), Yorkshire (1/19) e dois animais não foram informados (2/19). Os cães com melanoma eram Rottweiler (3/8), S.R.D. (2/8), Fox Paulistinha (1/8), Poodle (1/8) e um não foi informado (1/8). A idade dos cães com melanocitoma variou de três a 14 anos, com média de  $9,75 \pm 3,25$ , sendo que não foi obtida a idade de três animais; e dos cães com melanoma variou de seis a 14

anos, com média de  $9,25 \pm 2,76$ . Cinco melanomas (5/5) eram provenientes de gatos e compreenderam a totalidade das neoplasias analisadas na espécie (100%). Estas amostras foram provenientes de Persa (2/5), S.R.D. (2/5) e Angorá (1/5). A idade dos gatos variou de 3 a 11 anos, com média de  $7,8 \pm 3,96$ . Em nenhum animal foi encontrado melanoma amelanótico. A predominância anatômica das neoplasias em cães foi a úvea anterior (íris e corpo ciliar) (17/19 – 89,47%), com os demais casos em cães (2/19 – 10,53%) acometendo toda a úvea (íris, corpo ciliar e coroide) (Tabela 2). Em alguns cães, o melanoma infiltrava a córnea (7/8), a esclera (6/8), os compartimentos anterior e posterior (3/8), vasos sanguíneos (2/8), a retina (1/8), o nervo óptico (1/8), a musculatura retrobulbar (1/8) e também o ângulo de filtração, com obstrução do fluxo do humor aquoso (4/8). Em todos os gatos, os melanomas se localizavam na íris e no corpo ciliar (5/5) e, em alguns, infiltrava a córnea (1/5), a esclera (1/5), a retina (1/5) e obstruía o ângulo de filtração (4/5) (Figura 3).

**Tabela 2.** Localização anatômica das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

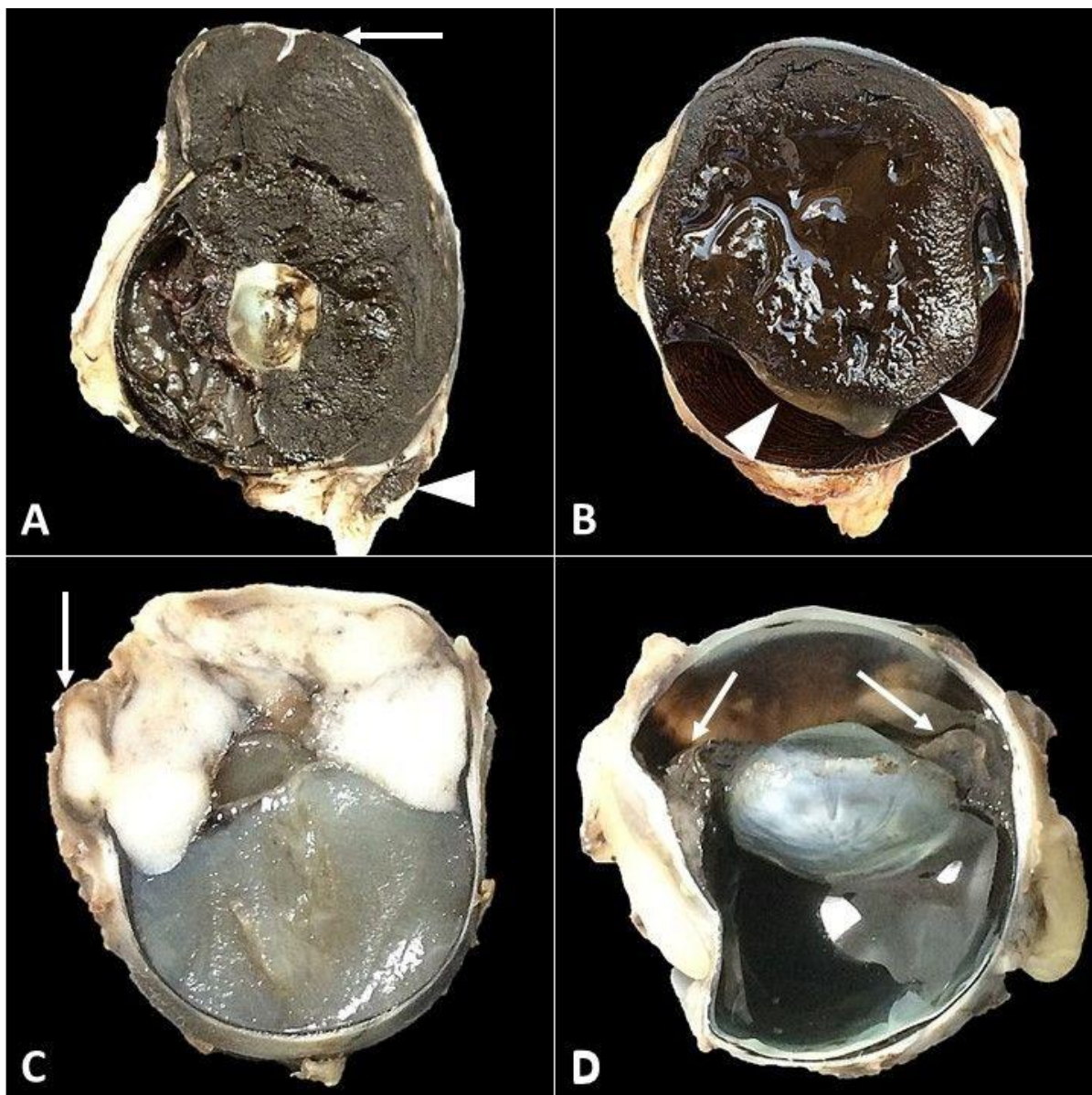
| Espécie | Tipo de neoplasia    | Localização anatômica                     |                                |   |
|---------|----------------------|---|--------------------------------|---|
|         |                      | Úvea anterior<br>(íris e corpo<br>ciliar) | Úvea<br>posterior<br>(coroide) | Trato uveal (íris, corpo<br>ciliar e coroide) |
| Cão     | Melanocitoma (19/27) | 17*                                       | ND**                           | 2   |
|         | Melanoma (8/27)      | 5***                                      | ND**                           | 3   |
| Gato    | Melanoma (5/5)       | 5   | ND                             | ND  |

\*Em 10 cães, a neoplasia se expandia à porção periférica da coroide de forma cordonal.

\*\*Nenhum animal teve acometimento exclusivo da úvea posterior.

\*\*\*Em um cão, a neoplasia infiltrava a porção periférica da coroide.

ND: não diagnosticado.



**Figura 3.** Macroscopia de bulbos oculares com neoplasia melanocítica uveal em cães e gatos. **A)** Melanocitoma panuveal em cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade, intensamente pigmentado, com preenchimento dos compartimentos anterior e posterior, expansão para a córnea (seta) e para região extraocular (cabeça de seta), obstrução do ângulo iridocorneal e luxação posterior do cristalino. **B)** Melanoma da úvea anterior em cão, Pinscher, fêmea, de 12 anos de idade, intensamente pigmentado, com invasão da coróide periférica, ocupação do compartimento anterior, obstrução do ângulo iridocorneal e descolamento de retina (cabeças de seta). **C)** Melanoma da úvea anterior em cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade, pouco pigmentado, com invasão da córnea e da esclera (seta), ocupação do compartimento anterior e obstrução do ângulo iridocorneal. **D)** Melanoma difuso da íris em gato, S.R.D., macho, de 11 anos de idade, moderadamente pigmentado, causando espessamento difuso da íris e do corpo ciliar (setas).

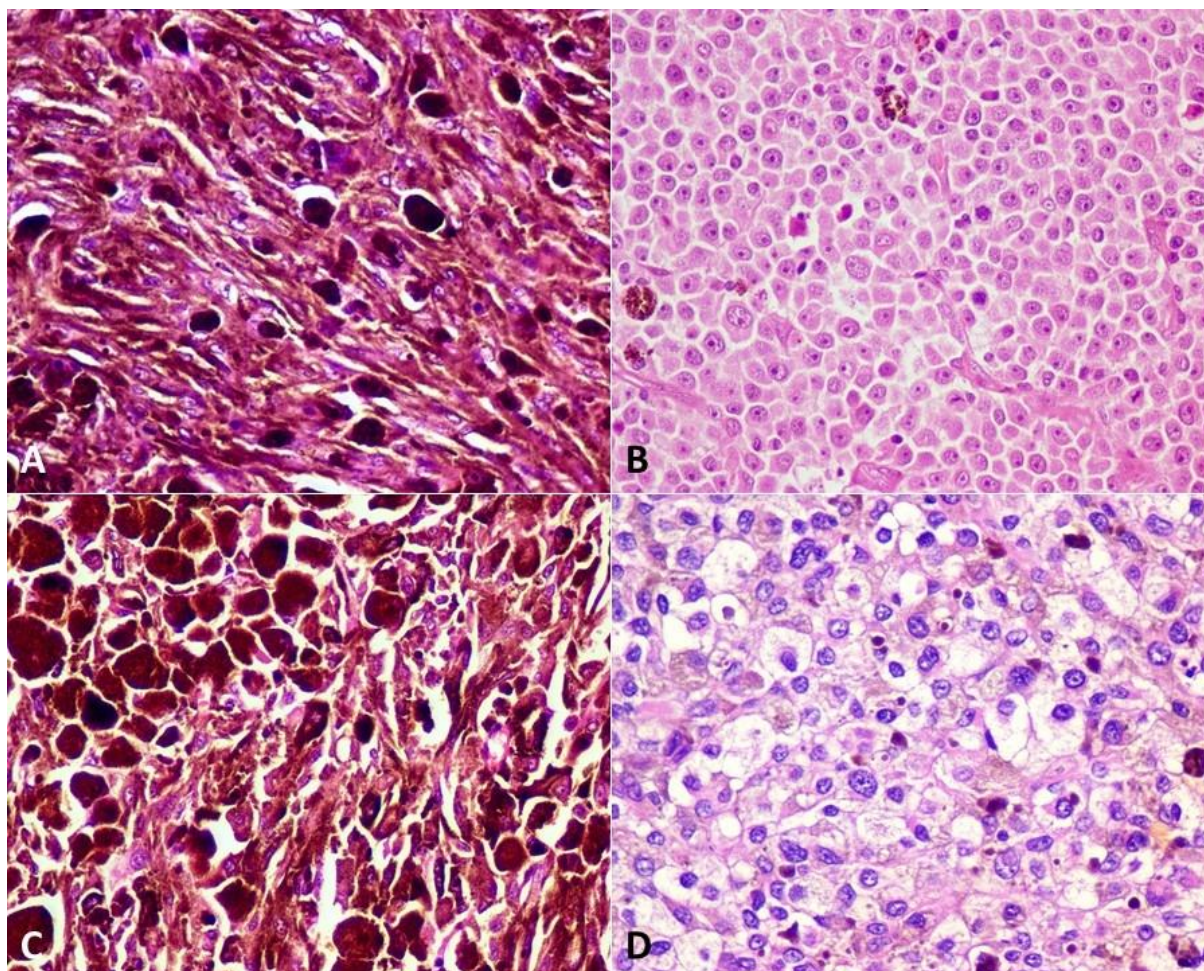
### 5.1. Avaliação morfológica comparativa entre melanocitomas e melanomas em cães e melanomas em gatos

A morfologia das células neoplásicas também foi estabelecida, obtendo-se os seguintes resultados: em cães com melanocitomas foram encontradas células mistas (12/19 – 63,15%), epitelioides (5/19 – 26,32%) e fusiformes (2/19 – 10,53%). Para os melanomas, foram identificadas células epitelioides (4/8 – 50%) e mistas (4/8 – 50%), não sendo identificadas células exclusivamente fusiformes nem tipos especiais de células neoplásicas (células balonosas, gigantes multinucleadas e em anel de sinete). Para os gatos com melanoma foram identificadas células balonosas (2/5 – 40%), epitelioides (1/5 – 20%), mistas (1/5 – 20%) e em anel de sinete (1/5 – 20%) (Tabela 3) (Figura 4).

**Tabela 3.** Morfologia celular das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

| Espécie (n) | Morfologia celular              | Melanocitoma | Melanoma |
|-------------|---------------------------------|--------------|----------|
| Cão (27)    | Fusiformes                      | 2            | ND       |
|             | Epitelioides                    | 5            | 4        |
|             | Mistas                          | 12           | 4        |
|             | Balonosas                       | ND           | ND       |
|             | Células gigantes multinucleadas | ND           | ND       |
|             | Anel de sinete                  | ND           | ND       |
| Gato (5)    | Fusiformes                      | ND           | ND       |
|             | Epitelioides                    | ND           | 1        |
|             | Mistas                          | ND           | 1        |
|             | Balonosas                       | ND           | 2*       |
|             | Células gigantes multinucleadas | ND           | ND       |
|             | Anel de sinete                  | ND           | 1        |

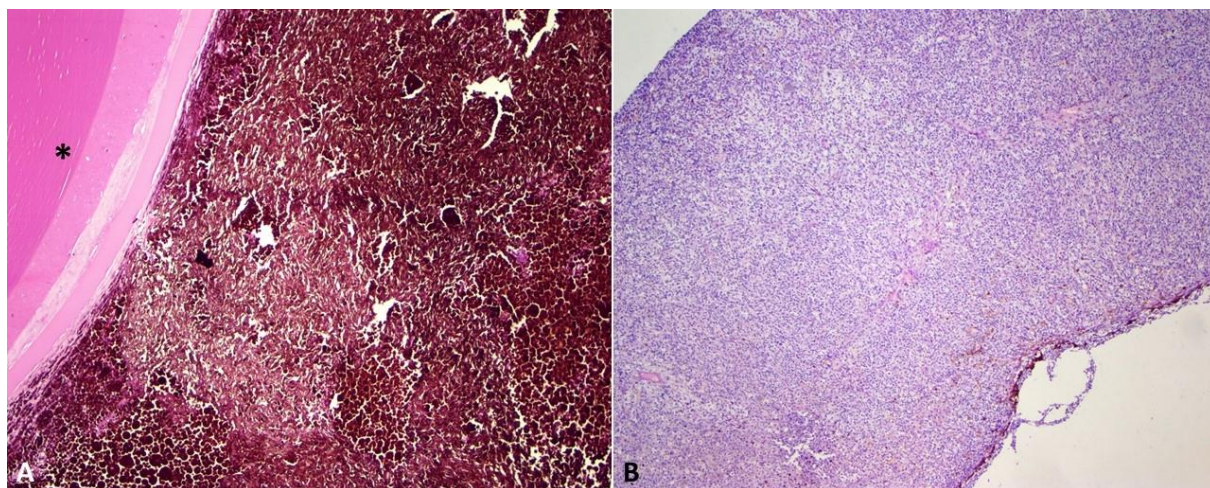
\*Gatos com mais de um tipo morfológico (células gigantes multinucleadas e em anel de sinete). ND: não diagnosticado.



**Figura 4.** Morfologia celular das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos. **A)** Melanocitoma de células fusiformes em cão, Pinscher, fêmea, de 12 anos de idade. **B)** Melanoma de células epitelioides em cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade. **C)** Melanocitoma de células mistas em cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade. **D)** Melanoma de células balonosas em gato, Persa, fêmea, 11 anos de idade. (Hematoxilina e eosina, 400x).

As neoplasias melanocíticas também foram avaliadas quanto à porcentagem de células neoplásicas com melanina. A maioria dos casos de melanocitomas dos cães (16/19 – 84,21%) eram intensamente pigmentados (entre 76-100%) e nos cães com melanomas (5/8 – 62,5%), predominou menor porcentagem de células pigmentadas (entre 26-50%). Nos gatos, os resultados foram semelhantes (3/5 – 60%), onde a porcentagem de células pigmentadas variou de 26-50% (Figura 5). Outro parâmetro avaliado foi a intensidade da pigmentação nas células neoplásicas: em melanocitomas em cães predominou o grau acentuado (14/19 – 73,69%) e nos malignos o moderado (4/8 – 50%). Nos cinco gatos com melanoma, a intensidade na pigmentação celular foi leve em dois animais, moderada em dois animais e acentuada em um animal. O número de casos com anisocitose e anisocariose foi semelhante entre melanocitomas e melanomas em cães, nos quais os graus leve e acentuado predominaram, respectivamente. E nos gatos predominou anisocitose e anisocariose em grau acentuado (4/5 – 80%). Com relação

a inflamação linfocitária intratumoral, nas neoplasias benignas e malignas de cães e de gatos, a intensidade mínima teve maior frequência (11/19 – 57,89%; 5/8 – 62,5%; 3/5 – 60%, respectivamente). A necrose intratumoral também foi avaliada. Nos melanocitomas em cães predominou a ausência de necrose (10/19 – 52,63%) e nos melanomas a necrose com intensidade acentuada (3/8 – 37,5%). Nos melanomas dos gatos, havia necrose intratumoral em dois animais (2/5 – 40%) (Tabela 4). O glaucoma decorrente das neoplasias melanocíticas foi encontrado em 47,37% (9/19) dos cães com melanocitoma e em 62,5% (5/8) dos cães com melanoma; nos gatos foi visualizado em 80% (4/5) dos animais. O índice mitótico médio nos melanocitomas em cães foi de  $1,16 \pm 0,41$  em 10 HPF, sendo que em diversos casos (13/19 – 68,42%) não foi possível a visualização nuclear pela intensa pigmentação celular. Nos melanomas de cães, o índice mitótico foi de  $19,125 \pm 16,105$  em 10 HPF. Nas neoplasias melanocíticas malignas em gatos, a média do índice mitótico foi de  $9,0 \pm 3,67$  em 10 HPF.



**Figura 5.** Melanocitoma e melanoma em bulbo ocular de cão e gato. **A)** Melanocitoma de úvea anterior intensamente pigmentado em cão, Pinscher, fêmea, de 12 anos de idade. Notar proximidade da neoplasia com cristalino (\*). **B)** Melanoma difuso de íris pouco pigmentado em gato, Persa, fêmea, 11 anos de idade. As células estão densamente arranjadas e com invasão e substituição do estroma da íris. (Hematoxilina e eosina, 40x).



**Tabela 4.** Caracterização histopatológica das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

| Parâmetro histológico                      | Número de casos      |              |              |
|--|----------------------|--------------|--------------|
|  | Cães                 |              | Gatos        |
|  | Melanocitoma<br>(19) | Melanoma (8) | Melanoma (5) |
| <b>% de células com melanina</b>           |                      |              |              |
| 1-25%                                      | 1                    | 2            | 1            |
| 26-50%                                     | 1                    | 5            | 3            |
| 51-75%                                     | 1                    | ND           | 1            |
| 76-100%                                    | 16                   | 1            | ND           |
| <b>Intensidade de melanina nas células</b> |                      |              |              |
| Mínimo (1-25%)                             | ND                   | ND           | ND           |
| Leve (26-50%)                              | 1                    | 2            | 2            |
| Moderado (51-75%)                          | 4                    | 4            | 2            |
| Acentuado (76-100%)                        | 14                   | 2            | 1            |
| <b>Anisocitose</b>                         |                      |              |              |
| Mínimo (1-25%)                             | 4                    | ND           | ND           |
| Leve (26-50%)                              | 11                   | 2            | ND           |
| Moderado (51-75%)                          | 4                    | 1            | 1            |
| Acentuado (76-100%)                        | ND                   | 5            | 4            |
| <b>Anisocariose*</b>                       |                      |              |              |
| Mínimo (1-25%)                             | 5                    | ND           | ND           |
| Leve (26-50%)                              | 11                   | 1            | ND           |
| Moderado (51-75%)                          | 1                    | 2            | 1            |
| Acentuado (76-100%)                        | ND                   | 5            | 4            |
| <b>Inflamação**†</b>                       |                      |              |              |
| Mínimo (1-25%)                             | 11                   | 5            | 3            |
| Leve (26-50%)                              | ND                   | ND           | ND           |
| Moderado (51-75%)                          | ND                   | 1            | ND           |
| Acentuado (76-100%)                        | ND                   | ND           | ND           |
| <b>Necrose***††</b>                        |                      |              |              |
| Mínimo (1-25%)                             | 8                    | 2            | 1            |
| Leve (26-50%)                              | 1                    | 1            | ND           |
| Moderado (51-75%)                          | ND                   | ND           | ND           |
| Acentuado (76-100%)                        | ND                   | 3            | 1            |

\*Em dois casos de cães os núcleos não foram visualizados pela pigmentação intensa.

\*\*Em oito casos de melanocitoma e dois de melanoma em cães não havia inflamação.

\*\*\*Em 10 casos de melanocitoma e dois de melanoma em cães não havia necrose.

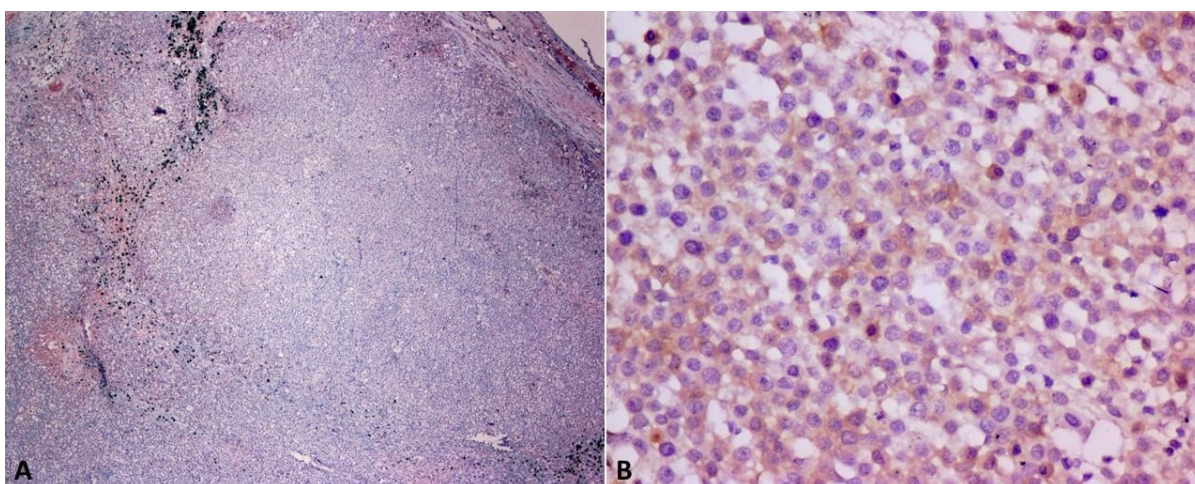
†Em dois casos de gatos não havia inflamação.

††Em três casos de gatos não havia necrose.

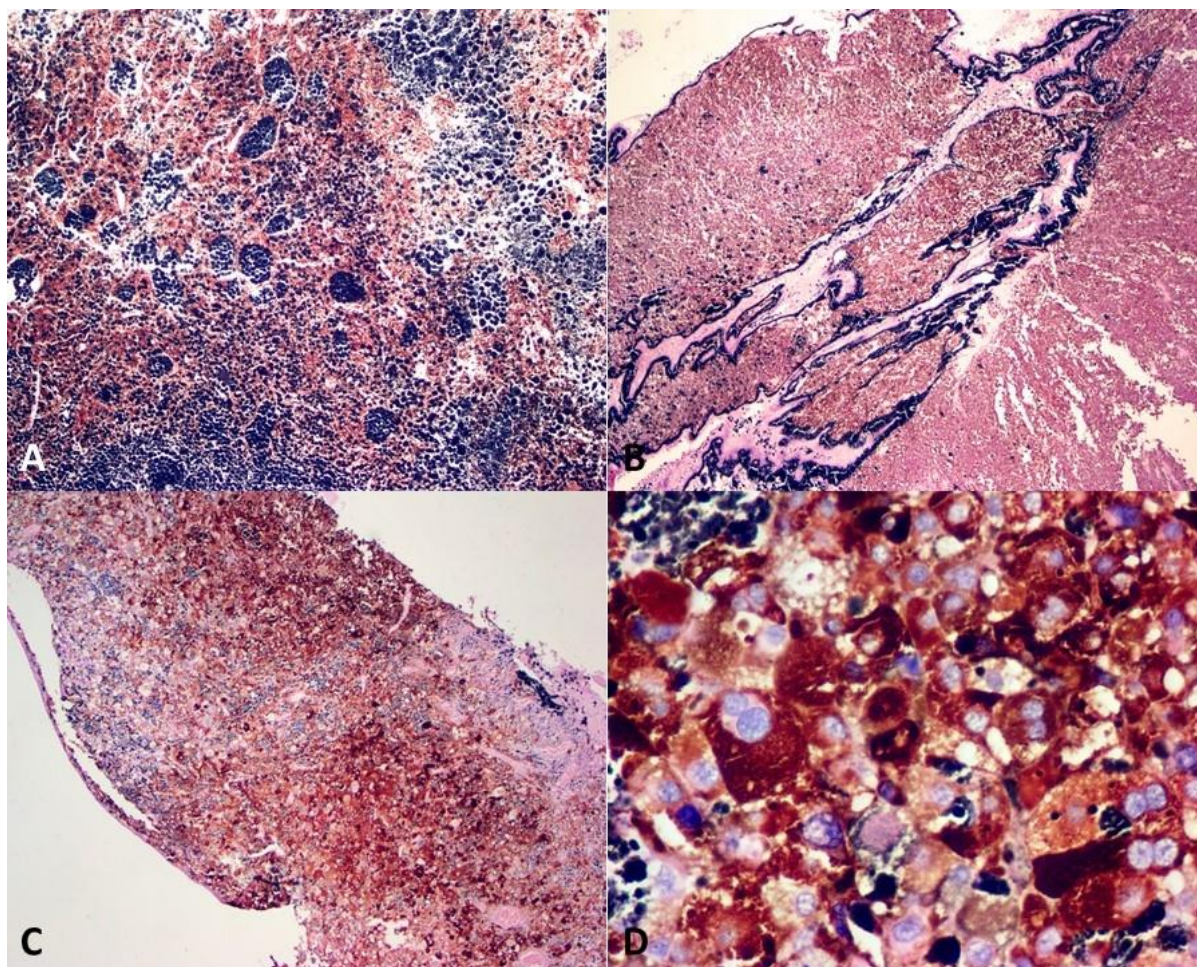
ND: não diagnosticado.

## 5.2. Avaliação imuno-histoquímica comparativa entre melanocitomas e melanomas em cães e melanomas em gatos

Dentre os 19 cães diagnosticados com melanocitoma uveal, apenas em um não se obteve imunomarcagem citoplasmática para PNL2 (18/19 – 94,74%). Quanto aos melanomas, seis cães foram positivos (6/8 – 75,0%). Nos três cães em que não houve positividade para PNL2, foi realizada imunomarcagem com anti-melan-A, com positividade citoplasmática nos três animais (Figura 6). Todos os gatos (5/5 – 100%) foram positivos para PNL2 (Tabela 5). Referente à graduação da imunomarcagem do PNL2, os melanocitomas dos cães tiveram ampla maioria graduada como acentuada (12/19 – 63,15%), com alguns casos como moderada (4/19 – 21,05%), leve (2/19 – 10,52%) ou ausente (1/19 – 5,26%). Para os melanomas, marcação para o PNL2 foi ausente (2/8 – 25%), mínima (2/8 – 25%), acentuada (2/8 – 25%), leve (1/8 – 12,5%) ou moderada (1/8 – 12,5%). Nos gatos, a maioria mostrou marcação acentuada (4/5 – 80%) e um animal com marcação mínima (1/5 – 20%) (Tabela 6) (Figura 7).

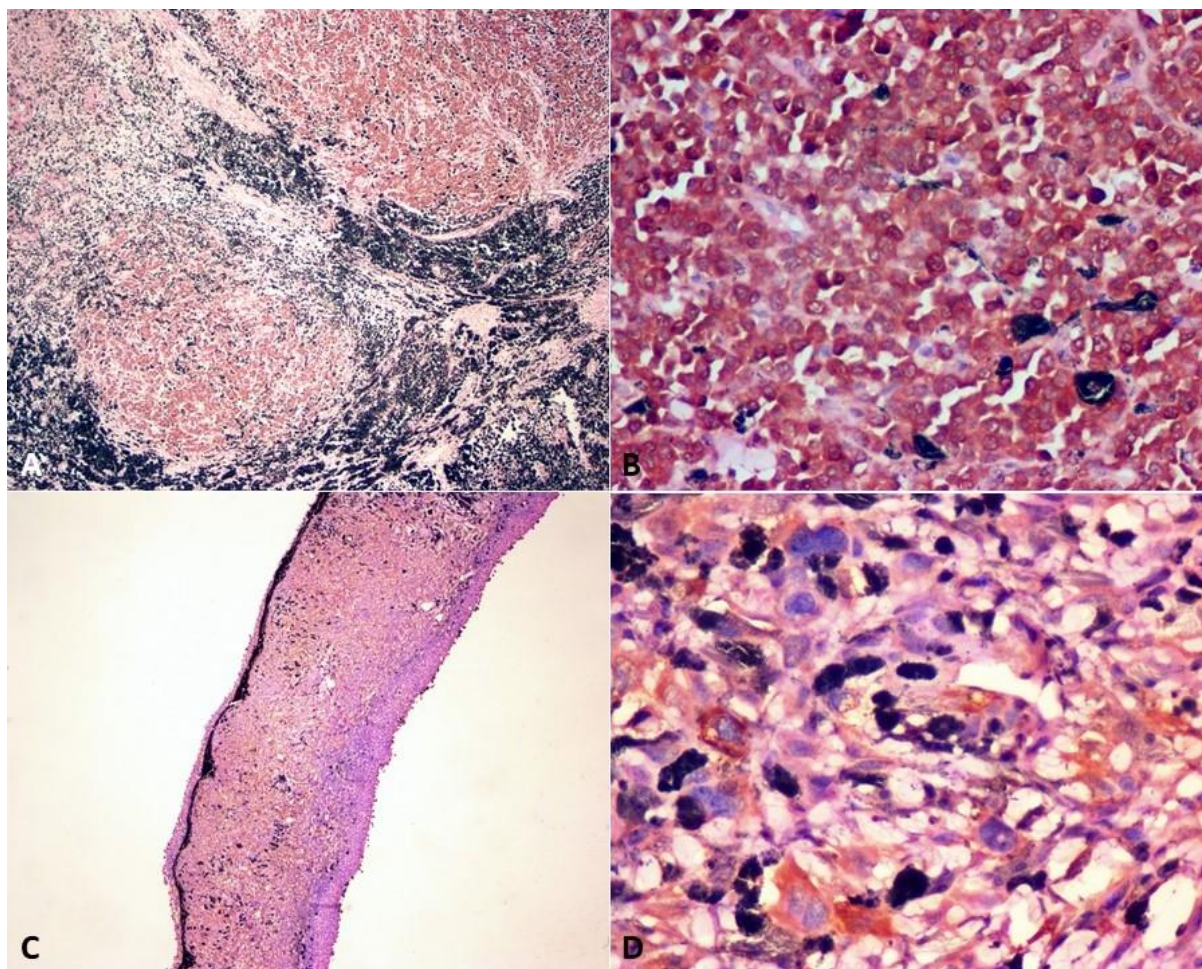


**Figura 6.** Imunomarcagem com anti-melan-A em melanoma uveal de cão, S.R.D., macho, de oito anos de idade. **A)** Marcação acentuada (40x). **B)** Maior aumento da imagem A demonstrando marcação citoplasmática (400x). Para todas as imagens foi utilizado o cromógeno DAB (marrom), contrastando com a melanina (verde). Contracoloração: Giemsa e hematoxilina.



**Figura 7.** Imunomarcção com anti-PNL2 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos. **A)** Melanocitoma em cão, Bulldog, macho, de sete anos de idade, com marcação moderada (40x). **B)** Melanoma em cão, Fox Paulistinha, fêmea, de oito anos de idade, com marcação acentuada (40x). **C)** Melanoma em gato, S.R.D., fêmea, de quatro anos de idade com marcação acentuada (40x). **D)** Maior aumento da imagem C demonstrando marcação citoplasmática (400x). Para todas as imagens foi utilizado o cromógeno DAB (marrom), contrastando com a melanina (verde). Contracoloração: Giemsa e hematoxilina.

Quanto à imunomarcção para BAP1, todas as neoplasias melanocíticas foram positivas (32/32 – 100%), com marcação citoplasmática predominante (Tabela 5). A graduação da imunomarcção para BAP1 está detalhada na Tabela 7. Para os melanocitomas dos cães, a maioria dos animais teve marcação multifocal (14/19 – 73,68%) e alguns tiveram marcação difusa (5/19 – 26,32%). Nos melanomas houve marcação multifocal (4/8 – 50%) ou difusa (4/8 – 50%). O resultado foi semelhante para os melanomas em gatos, obtendo-se imunomarcção multifocal (3/5 – 60%) e difusa (2/5 – 40%), com nenhuma marcação classificada como ausente (Figura 8).



**Figura 8.** Imunomarcção com anti-BAP1 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos. **A)** Melanocitoma em cão, Rottweiler, fêmea, de 12 anos de idade, com marcação multifocal (40x). **B)** Melanoma em cão, Rottweiler, macho de seis anos de idade, com marcação difusa nuclear e citoplasmática (400x). **C)** Melanoma em gato, S.R.D., macho, de 11 anos de idade, com marcação multifocal (40x). **D)** Maior aumento da imagem C demonstrando marcação citoplasmática (400x). Para todas as imagens foi utilizado o cromógeno DAB (marrom), contrastando com a melanina (verde). Contracoloração: Giemsa e hematoxilina.

**Tabela 5.** Resultados da imunomarcção nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

| Espécie | Diagnóstico (nº/total) | PNL2 |    | Melan-A* |    | BAP1 |    |
|---------|------------------------|------|----|----------|----|------|----|
|         |                        | NP   | NN | NP       | NN | NP   | NN |
| Cães    | Melanocitoma (19/27)   | 18   | 1  | 1        | ND | 19   | ND |
|         | Melanoma (8/27)        | 6    | 2  | 2        | ND | 8    | ND |
| Gatos   | Melanoma (5/5)         | 5    | ND | ND       | ND | 5    | ND |

\*Melan-A foi realizado apenas nos casos de PNL2 negativos.

NP: números de animais positivos. NN: números de animais negativos.

ND: não diagnosticado.

**Tabela 6.** Graduação imuno-histoquímica de PNL2 nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

| Espécie | Diagnóstico  | Graduação           | PNL2 |
|---------|--------------|---------------------|------|
| Cão     | Melanocitoma | Ausente (0-9%)      | 1    |
|         |              | Mínimo (10-25%)     | ND   |
|         |              | Leve (26-50%)       | 2    |
|         |              | Moderado (51-75%)   | 4    |
|         |              | Acentuado (76-100%) | 12   |
|         | Melanoma     | Ausente (0-9%)      | 2    |
|         |              | Mínimo (10-25%)     | 2    |
|         |              | Leve (26-50%)       | 1    |
|         |              | Moderado (51-75%)   | 1    |
|         |              | Acentuado (76-100%) | 2    |
| Gato    | Melanoma     | Ausente (0-9%)      | ND   |
|         |              | Mínimo (10-25%)     | 1    |
|         |              | Leve (26-50%)       | ND   |
|         |              | Moderado (51-75%)   | ND   |
|         |              | Acentuado (76-100%) | 4    |

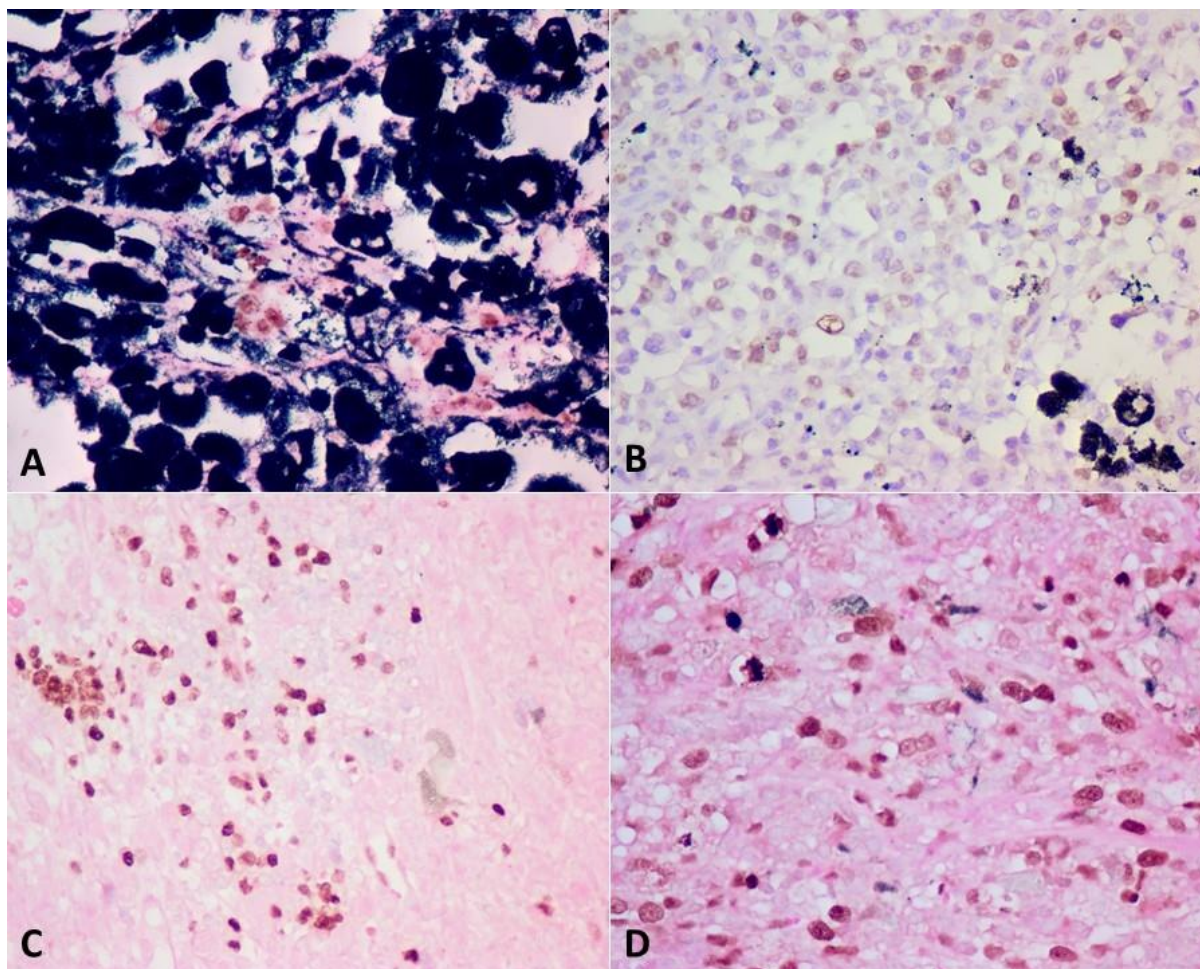
ND: não diagnosticado.

**Tabela 7.** Graduação imuno-histoquímica de BAP1 nas neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

| Espécie | Diagnóstico  | Graduação           | BAP1 |
|---------|--------------|---------------------|------|
| Cão     | Melanocitoma | Ausente (<10%)      | ND   |
|         |              | Multifocal (10-90%) | 14   |
|         |              | Difusa (>90%)       | 5    |
|         | Melanoma     | Ausente (<10%)      | ND   |
|         |              | Multifocal (10-90%) | 4    |
|         |              | Difusa (>90%)       | 4    |
| Gato    | Melanoma     | Ausente (<10%)      | ND   |
|         |              | Multifocal (10-90%) | 3    |
|         |              | Difusa (>90%)       | 2    |

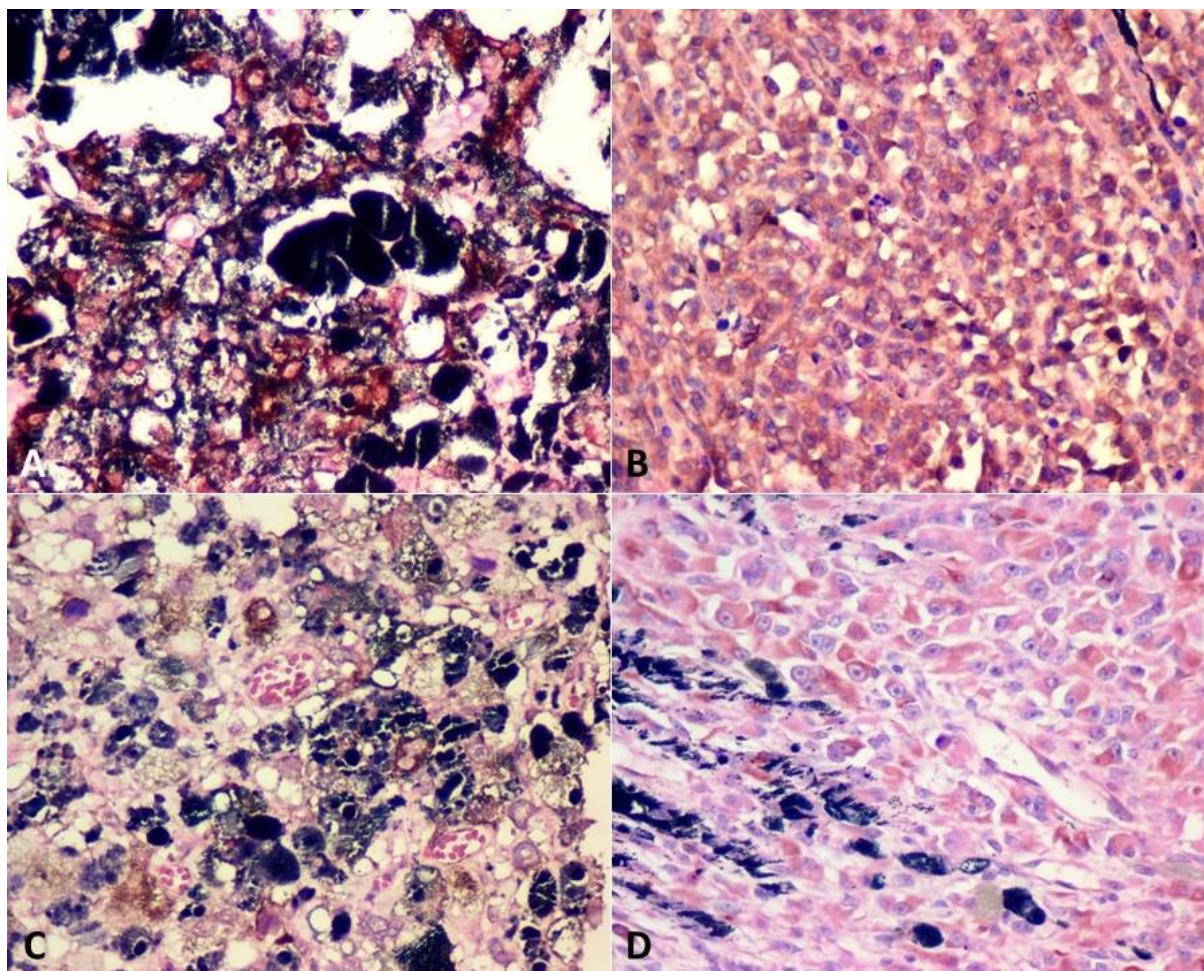
ND: não diagnosticado.

O índice proliferativo celular em cães, obtido pela imunomarcção nuclear das células neoplásicas com anti-Ki-67 variou de 2,8 a 12% em melanocitomas, com média de  $6,45 \pm 4,1$  e de 15,8 a 70% em melanomas, com média de  $38,3 \pm 25,21$ . Não foi possível realizar a quantificação do índice proliferativo em 19 cães. Os melanomas em gatos tiveram variação do índice proliferativo de 10,8 a 30,4%, com média de  $18,96 \pm 7,36$  (Figura 9).



**Figura 9.** Imunomarcaco com anti-Ki-67 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos. **A)** Melanocitoma em cão, Basset Hound, fêmea, de 13 anos de idade, com baixo ndice proliferativo. **B)** Melanoma em cão, Rottweiler, macho, de seis anos de idade, com alto ndice proliferativo. **C)** Melanoma em gato, Angorá, macho, de três anos de idade, com ndice proliferativo moderado. **D)** Melanoma em gato, Persa, fêmea, de 11 anos de idade, com alto ndice proliferativo. A, C e D: Contracolorao: Giemsa. B: Contracolorao: hematoxilina. Para todas as imagens foi utilizado o cromógeno DAB (marrom) e a marcao  nuclear.

A marcao citoplasmática para confirmar o ndice apoptótico em cães, com anti-caspase-3, variou de 3,8 a 50% em melanocitomas, com média de  $16,62 \pm 13,26$  e de 30 a 84% em melanomas, com média de  $58,04 \pm 24,25$ , obtendo alta porcentagem de marcao tanto para neoplasias benignas quanto para malignas, mas com marcao maior nos melanomas. Não foi possível realizar a quantificao do ndice proliferativo em 12 cães, especialmente para amostras com proporo alta de melanina. Nos gatos variou de 3,6 a 92%, com média de  $23,16 \pm 38,62$  (Figura 10).



**Figura 10.** Imunomarcaco com anti-caspase-3 em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos. **A)** Melanocitoma em cão, Basset Hound, fêmea, de 13 anos de idade, com baixo ndice apoptótico. **B)** Melanoma em cão, Rottweiler, macho, de seis anos de idade, com alto ndice apoptótico. **C)** Melanoma em gato, S.R.D., fêmea, de quatro anos de idade, com baixo ndice apoptótico. **D)** Melanoma em gato, Angorá, macho, de três anos de idade, com alto ndice apoptótico. Para todas as imagens foi utilizado o cromógeno DAB (marrom), contrastando com a melanina (verde) e a marcao  nuclear. Contracolorao: Giemsa e hematoxilina (400x).

## 6. DISCUSSÃO

As características morfológicas associadas aos marcadores anti-PNL2 e anti-melan-A foram importantes na confirmao do diagnóstico de neoplasias melanocíticas uveais nos animais do presente estudo. A marcao anti-anti-Ki-67 e anti-caspase-3 auxiliaram na definio do comportamento biológico com relao  malignidade. Além disso, a avaliao quantitativa da marcao anti-PNL2 e anti-BAP1 mostraram resultados ainda não relatados para os tumores melanocíticos uveais em cães e gatos. Essas características são importantes de serem avaliadas mesmo após a enucleao, pois a associao de elevado ndice proliferativo com baixo ndice apoptótico podem indicar maior agressividade tumoral.

Os melanocitomas uveais nos cães deste estudo foram mais frequentes que os melanomas, corroborando com a literatura (Wilcock e Peiffer, 1986; Dubielzig et al., 2010; Wilcock e Njaa, 2016); entretanto, neste trabalho obteve-se aproximadamente 30% de melanomas na úvea anterior, sendo o dobro do relatado em outros estudos (Wilcock e Peiffer, 1986; Wilcock e Njaa, 2016). Em contrapartida, a totalidade dos neoplasmas nos gatos foram malignos, corroborando com estudos prévios (Dubielzig et al., 2010; Wilcock e Njaa, 2016).

Para os cães, as neoplasias melanocíticas de uma forma geral foram frequentemente encontradas na úvea anterior, como relatado por Dubielzig et al. (2010) e Wilcock e Njaa (2016); entretanto, em diversos cães com melanocitoma, as células neoplásicas se expandiam para a porção periférica da coroide, de forma cordonal e, em outros dois cães com melanocitoma, a distribuição era difusa na úvea. Portanto, estas neoplasias podem ser classificadas como benignas, mas com consequência maligna para a arquitetura tecidual local, como salientado por Wilcock e Peiffer (1986). Nos melanomas dos cães houve a invasão de células neoplásicas na córnea, esclera, retina, vasos sanguíneos, músculos retrobulbares e nervo óptico, o que sugere um prognóstico desfavorável (Miller, 2008). Nos gatos, a localização predominante dos melanomas foi o estroma iridal com infiltração no corpo ciliar e, em alguns gatos, com infiltração em córnea, esclera e retina, sendo um fator de risco para metástase (Kalishman et al., 1998). Não foi encontrado nenhum gato com invasão neoplásica na coroide, o que Wiggans et al. (2016) salientam ser predisponente para a ocorrência de metástases.

Tanto nos cães como nos gatos do presente estudo, as células neoplásicas obstruíram o ângulo iridocorneal, culminando com a não drenagem do humor aquoso e consequente glaucoma secundário, sendo outro importante fator prognóstico para metástases (Kalishman et al., 1998). Esta relação com o prognóstico ocorre porque a alteração ocular torna-se evidente para o proprietário quando há glaucoma devido a buftalmia, favorecendo assim o encaminhamento mais precoce do animal ao médico veterinário. Entretanto, com frequência o exame do animal ocorre em estágio avançado, culminando com a enucleação, como constatado nos cães e gatos desse estudo. Com a enucleação tardia podem ocorrer metástases, como constatado em alguns relatos (Hyman et al., 2002; Delgado et al., 2016).

Morfologicamente, os melanocitomas possuem maior pigmentação, contendo células redondas e fusiformes e geralmente com menos de quatro mitoses por 10 HPF. Em contrapartida, os melanomas são menos pigmentados ou amelanóticos, têm pleomorfismo celular e nuclear intenso e geralmente possuem mais de quatro mitoses por 10 HPF (Dubielzig et al., 2010; Koopmans et al., 2014; Goldschmidt e Goldschmidt, 2017), corroborando com os resultados desse estudo para as neoplasias melanocíticas uveais dos cães e gatos. No presente



estudo, as células com características epitelioides e mistas foram as mais encontradas em melanomas oculares de cães. Entretanto, nos gatos, as células balonosas foram as mais frequentes, havendo ainda outros tipos celulares especiais, como células em anel de sinete e células gigantes multinucleadas.

Nos melanomas uveais dos cães e dos gatos do presente estudo havia também inflamação e necrose intratumoral, os quais foram propostos como indicadores de metástases (Wiggans et al., 2016) e, conseqüentemente, prognóstico desfavorável (Spangler e Kass, 2006; Wiggans et al., 2016).

A avaliação de proliferação celular é de extrema importância em neoplasias melanocíticas. Em função disso, o anti-Ki-67 é considerado um marcador extremamente sensível e útil na avaliação prognóstica e monitoramento do tratamento da doença, bem como para avaliar o risco de desenvolvimento de metástases do melanoma (Brown e Gatter, 2002). Alguns autores recomendam que, em neoplasias melanocíticas em cães, ao exceder três mitoses em 10 HPF, as neoplasias extraoculares podem ser consideradas malignas (Smedley et al., 2011). Para gatos com melanoma difuso de íris, a contagem mitótica abaixo de sete em 10 HPF sugere um prognóstico mais favorável relacionado a metástase (Wiggans et al., 2016). Baseado nesses dados, os melanocitomas deste estudo tiveram quantificação menor que três mitoses e os melanomas dos cães tiveram mais que três mitoses em 10 HPF. Com relação aos gatos, apenas um animal apresentou menos de sete mitoses em 10 HPF. Contudo, a marcação imunohistoquímica pelo anticorpo anti-Ki-67 auxiliou na avaliação das células que não estavam em processo de mitose, mas estavam em proliferação, e aumentou a sensibilidade para o cálculo do índice proliferativo, como relatado por Roels et al. (1999) e Bergin et al. (2011). Foram encontrados melanomas uveais com índice proliferativo extremamente alto em cães (70%) e em gatos (30,4%), o que indica maior agressividade tumoral (Weinstein et al., 2014) e maior potencial de desenvolver metástases (Angi et al., 2011). Estes resultados corroboram ainda com Smedley et al. (2011), que afirmam que cães com melanomas extraoculares, com índice proliferativo maior ou igual a 15%, têm pior prognóstico.

O índice apoptótico das neoplasias melanocíticas também é importante de ser avaliado, pois o alto índice apoptótico indica a capacidade da neoplasia em reduzir o crescimento, sendo considerado inversamente proporcional ao índice proliferativo (Stauton e Gaffney, 1995; Glinsky et al., 1997). Entretanto, os estudos de apoptose em neoplasias melanocíticas são escassos e, particularmente nas neoplasias uveais de animais, não há relatos do uso de marcadores apoptóticos, não sendo possível fazer uma comparação com outros estudos em animais. Neste trabalho, foi encontrado índice apoptótico elevado tanto em melanocitomas

quanto em melanomas em cães e gatos, contradizendo a literatura humana (Stauton e Gaffney, 1995; Glinsky et al., 1997). Sabe-se que a ausência de fatores de crescimento, a hipóxia e a incidência de radiações são causas do desencadeamento da cascata de apoptose celular (Jiang e Wang, 2000; Soengas e Lowe, 2003; Lavrik et al., 2005; Elmore, 2007). Dessa forma, sugere-se que a marcação intensa por anti-caspase-3 em neoplasias malignas possa ser devido à escassez de nutrientes via irrigação sanguínea, à intensa radiação ultravioleta à qual a úvea anterior está predisposta a receber e ao espaço físico limitado para o crescimento celular que o bulbo ocular permite, sendo regulada tanto por sinais negativos quanto positivos (Jiang e Wang, 2000; Soengas e Lowe, 2003; Lavrik et al., 2005; Elmore, 2007).

O anticorpo anti-PNL2 demonstrou ser um excelente marcador para as neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos, como descrito por Giudice et al. (2010), Ramos-Vara e Miller (2011), Wiggans et al. (2016) e Smedley et al. (2011). Entretanto, em alguns casos não houve marcação citoplasmática pelo anti-PNL2, sendo necessária a utilização do anticorpo anti-melan-A para comprovação da linhagem melanocítica da neoplasia. Não se sabe a causa da ausência de imunomarcação pelo anti-PNL2, pois, como relatado em outros estudos, o antígeno resiste a tempo de fixação prolongado em formalina (Ramos-Vara e Miller, 2011), o que poderia ser um fator importante, visto que não se sabe o tempo de fixação a que algumas amostras foram expostas. Contudo, esses resultados demonstraram que, ao obter negatividade pelo PNL2 em melanomas uveais, este diagnóstico não pode ser descartado e a amostra deve ser submetida à marcação pelo melan-A.

A supressão tumoral também foi testada neste estudo e verificou-se, por imunomarcação com o anticorpo anti-BAP1, que a utilização da BAP1 como marcador prognóstico em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos, aparentemente não é útil, pois não houve diferença na intensidade da marcação entre as neoplasias benignas e malignas, contrariando os estudos em neoplasias melanocíticas em seres humanos, em que a malignidade da neoplasia coincidia com a diminuição da imunomarcação (Wiesner et al., 2011; Shah et al., 2013; Koopmans et al., 2014). Ressalta-se que, em algumas neoplasias intensamente pigmentadas, obteve-se baixa imunomarcação. Possivelmente, a quantidade de pigmento interfere na reatividade do anticorpo e, conseqüentemente, com os resultados dessa marcação em neoplasias melanocíticas. Outro ponto que merece destaque é a localização da marcação da BAP1, onde neste estudo foi predominantemente citoplasmática, contrapondo-se aos trabalhos com melanomas uveais em seres humanos (Kalirai et al., 2014) e em melanomas uveais e de mucosa oral em cães (Jama et al., 2018), nos quais a marcação citoplasmática sempre é acompanhada da marcação nuclear e, em outros trabalhos em seres humanos, a marcação foi exclusivamente

nuclear (Shah et al., 2013; Koopmans et al., 2014). Devido a essas diferenças de localização da imunomarcacão verificadas na literatura humana e veterinária, possivelmente o anticorpo da proteína BAP1 sintetizado para o uso em seres humanos não é válido para cães e gatos. Recomendam-se mais estudos sobre o uso do anticorpo anti-proteína BAP1, a fim de testar a validade do seu uso em cães e gatos, seguindo os critérios descritos para os métodos de validação (Caswell et al., 2018). Jama et al. (2018) comentam ainda que não recomendam a proteína BAP1 como fator prognóstico em cães, pois todas as suas amostras obtiveram marcação nuclear, não havendo casos sem imunomarcacão, semelhante aos animais deste estudo, em que todos animais tiveram algum padrão de marcação.

## **7. CONCLUSÕES**

As características morfológicas e imuno-histoquímicas encontradas neste estudo podem contribuir em melhor esclarecimento no uso destas ferramentas como marcadores prognósticos metastáticos das neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

O anticorpo anti-PNL2 corrobora com estudos prévios de ser um excelente marcador para neoplasias melanocíticas uveais; entretanto, não se pode excluir o diagnóstico de neoplasia melanocítica quando não houver a imunomarcacão. Para isto, alternativamente pode ser utilizado o anti-melan-A.

As neoplasias melanocíticas uveais mais agressivas apresentaram alto índice proliferativo; entretanto, o índice apoptótico foi elevado tanto para melanocitomas quanto para melanomas uveais de cães e gatos.

A proteína BAP1 não apresentou diferença de intensidade de marcação entre os tipos de neoplasia e entre as morfologias celulares; no entanto, sua marcação foi predominantemente citoplasmática. Sugerem-se mais estudos sobre esta proteína para esclarecer melhor sua atuação em neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos.

## **8. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Para o conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho que compara as neoplasias melanocíticas uveais benignas e malignas em cães e gatos, em que foi realizado um amplo estudo morfológico e imuno-histoquímico. A técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo anti-caspase-3 para as neoplasias melanocíticas uveais em cães e gatos foi padronizada; entretanto, para o anti-BAP1 há necessidade de outros estudos para validação.

Diante da dificuldade de obtenção de amostras de bulbos oculares de animais com neoplasias melanocíticas uveais, bem como a dificuldade de rastreamento destes animais para

o acompanhamento pós-diagnóstico da doença ocular, mais estudos são necessários para o melhor entendimento do índice metastático e consequente sobrevida destes animais.

## 9. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M.H.; PILARSKI, R.; CEBULLA, C.M.; MASSENGILL, J.B.; CHRISTOPHER, B.N.; BORU, G.; HOVLAND, P.; DAVIDORF, F.H. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J. Med. Genet.*, v.48, n.12, p.856-859, 2011.

ANGI, M.; DAMATO, B.; KALIRAI, H.; DODSON, A.; TAKTAK, A.; COUPLAND, S.E. Immunohistochemical assessment of mitotic count in uveal melanoma. *Acta Ophthalmol.*, v.89, n.2, p.e155-e160, 2011.

AUNG, P.P.; RIKALA, M-S.; LASOTA, J.; LAI, J-P.; WANG, Z-F.; MIETTINEN, M. KBA62 and PNL2: Two newer melanoma markers - Immunohistochemical analysis of 1563 tumors including metastatic, desmoplastic, and mucosal melanomas and their mimics. *Am J Surg Pathol.*, v.36, n.2, p.265-272, 2012.

BANERJEE, S.S.; HARRIS, M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathol.*, v.36, n.5, p.387-402, 2000.

BERGIN, I.L.; SMEDLEY, R.C.; ESPLIN, D.G.; SPANGLER, W.L.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet. Pathol.*, v.48, n.1, p.41-53, 2011.

BHEDA, A.; SHACKELFORD, J.; PAGANO, J.S. Expression and functional studies of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 regulated genes. *PLoS One*, v.4, n.8, e6764, 2009.

BRENNER, M.; HEARING, V.J. What are melanocytes really doing all day long...? : from the ViewPoint of a keratinocyte: Melanocytes – cells with a secret identity and incomparable abilities. *Exp. Dermatol.*, v.18, n.9, p.799-819, 2009.

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathol.*, v.40, p.2-11, 2002.

CANGUL, I.T.; VAN GARDEREN, E.; VAN DER LINDE-SIPMAN, J.S.; VAN DEN INGH, T.S.G.A.M.; SCHALKEN, J.A. Canine balloon and signet-ring cell melanomas: a histological and immunohistochemical characterization. *J. Comp. Pathol.*, v.125, n.2-3, p.166-173, 2001.

CASWELL, J.L.; BASSEL, L.L.; ROTHENBURGER, J.L.; GRÖNE, A.; SARGEANT, J.M.; BECK, A.P.; EKMAN, S.; GIBSON-CORLEY, K.N.; KUIKEN, T.; LADOUCEUR, E.E.B.; MEYERHOLZ, D.K.; ORIGGI, F.C.; POSTHAUS, H.; PRIESTNALL, S.L.; RESSEL, L.; SHARKEY, L.; TEIXEIRA, L.B.C.; UCHIDA, K.; WARD, J.M. WEBSTER, J.D.; YAMATE, J. Observational Study Design in Veterinary Pathology, Part 2: Methodology. *Vet. Pathol.*, v.55, n.6, p.774-785, 2018.

CARBONE, M.; FERRIS, L.K.; BAUMANN, F.; NAPOLITANO, A.; LUM, C.A.; FLORES, E.G.; GAUDINO, G.; POWERS, A.; BRYANT-GREENWOOD, P.; KRAUSZ, T.; HYJEK,

E.; TATE, R.; FRIEDBERG, J.; WEIGEL, T.; PASS, H.I.; YANG, H. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J. Transl. Med.*, v.10, n.179, p.1-7, 2012.

CARBONE, M.; YANG, H.; PASS, H.I.; KRAUSZ, T.; TESTA, J.R.; GAUDINO, G. BAP1 and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, v.13, n.3, p.153-159, 2013.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMIŃSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. *Postep. Derm. Alergol.*, v.30, n.1, p.30-41, 2013.

CHEN, Y.T.; STOCKERT, E.; JUNGBLUTH, A.; TSANG, S.; COPLAN, K.A.; SCANLAN, J.; OLD, L.J. Serological analysis of Melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expresses in human melanomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, n.12, p.5915-5919, 1996.

COSMIC. Catalogue of somatic mutations in cancer. Disponível em: <<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=BAP1>>. Acessado em: 19 de janeiro de 2018.

DAY, M.J.; LUCKE, V.M. Melanocytic neoplasia in the cat. *J. Small Anim. Pract.*, v.36, n.5, p.207-213, 1995.

DELGADO, E.; SILVA, J.X.; PISSARRA, H.; PELETEIRO, M.C.; DUBIELZIG, R.R. Late prostatic metastasis of an uveal melanoma in a miniature Schnauzer dog. *Clin. Case Rep.*, v.4, n.7, p.647-652, 2016.

DUBIELZIG, R.R.; STEINBERG, H.; GARVIN, H.; DEEHR, A.J.; FISCHER, B. Iridociliary epithelial tumors in 100 dogs and 17 cats: a morphological study. *Vet. Ophthalmol.*, v.1, p.223-231, 1998.

DUBIELZIG, R.R.; KETRING, K.L.; MCLELLAN, G.J.; ALBERT, D.M. *Veterinary Ocular Pathology: a comparative review*. 1 ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. 456p.

EDGE & AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Malignant melanoma of the uvea. In: *AJCC Cancer Staging Manual*. 6 ed. Chicago: Springer, 2010. p.365-370.

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

FERNANDES, B.F.; ODASHIRO, A.N.; SARAIVA, V.S.; LOGAN, P.; ANTECKA, E.; BURNIER JR, M.N. Immunohistochemical expression of melan-A and tyrosinase in uveal melanoma. *J. Carcinog.*, v.6, p.1-6, 2007.

GIUDICE, C.; CECILIANI, F.; RONDENA, M.; STEFANELLO, D.; GRIECO, V. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.22, p.389-394, 2010.

GLINSKY, G.V.; GLINSKY, V.V.; IVANOVA, A.B.; HUESER, C.J. Apoptosis and metastasis: increased apoptosis resistance of metastatic cancer cells is associated with the

profound deficiency of apoptosis execution mechanisms. *Cancer Letters*, v.115, n.2, p.185-193, 1997.

GOLDSCHMIDT, M.H.; DUNSTAN, R.W.; STANNARD, A.A.; VON TSCHARNER, C.; WALDER, E.J.; YAGER, J.A. Histological classification of epithelial and melanocytic neoplasms of the skin of domestic animals. In: *World Health Organization International Histological Classification of Neoplasms of Domestic Animals*. 2nd series, vol. III. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1998. p.38-40.

GOLDSCHMIDT, M.H.; GOLDSCHMIDT, K.H. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). *Tumors in Domestic Animals*. 5 ed. Ames, IA: Wiley Blackwell, 2017. p.123-132.

GOTO, H.; MOTOMURA, S.; WILSON, A.C.; FREIMAN, R.N.; NAKABEPPU, Y.; FUKUSHIMA, K.; FUJISHIMA, M.; HERR, W.; NISHIMOTO, T. A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes Dev.*, v.11, n.6, p.726-737, 1997.

GREENBERG, R.A.; SOBHIAN, B.; PATHANIA, S.; CANTOR, S.B.; NAKATANI, Y.; LIVINGSTON, D.M. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.*, v.20, n.1, p.34-46, 2006.

HARBOUR, J.W.; ONKEN, M.D.; ROBERSON, E.D.O.; DUAN, S.; CAO, L.; WORLEY, L.A.; COUNCIL, M.L.; MATATALL, K.A.; HELMS, C.; BOWCOCK, A.M. Frequent Mutation of BAP1 in Metastasizing Uveal Melanomas. *Science*, v.330, n.6009, p.1410-1413, 2010.

HESSE, K.L.; FREDO, G.; GUIMARÃES, L.L.B.; REIS, M.O.; PIGATTO, J.A.T.; PAVARINI, S.P.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L. Neoplasmas oculares e de anexos em cães e gatos no Rio Grande do Sul: 265 casos (2009 -2014). *Pesq. Vet. Bras.*, v.35, n.1, p.49-54, 2015.

HU, D.N. Photobiology of Ocular Melanocytes and Melanoma. *Photochem. Photobiol.*, v.81, n.3, p.506-509, 2005.

HYMAN, J.A.; KOCH, S.A.; WILCOCK, B.P. Canine choroidal melanoma with metastases. *Vet. Ophthalmol.*, v.5, n.2, p.113-117, 2002.

JAMA, N.; FARQUHAR, N.; BUTT, Z.; COUPLAND, S. E.; SACCO, J.J.; SCASE, T.; FIELDING, A.B.; COULSON, J.M.; KALIRAI, H.; KILLICK, D.R. Altered Nuclear Expression of the Deubiquitylase BAP1 Cannot be Used as a Prognostic Marker for Canine Melanoma. *J. Comp. Path.*, v.162, p.50-58, 2018.

JENSEN, D.E.; PROCTOR, M.; MARQUIS, S.T.; GARDNER, H.P.; HA, S.I.; CHODOSH, L.A.; ISHOV, A.M.; TOMMERUP, N.; VISSING, H.; SEKIDO, Y.; MINNA, J.; BORODOVSKY, A.; SCHULTZ, D.C.; WILKINSON, K.D.; MAUL, G.G.; BARLEV, N.; BERGER, S.L.; PRENDERGAST, G.C.; RAUSCHER, F.J.3rd. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, v.16, n.9, p.1097-1112, 1998.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *J. Biol. Chem.*, v.275, n.40, p.31199-31203, 2000.

JULIEN, E.; HERR, W. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J.*, v.22, n.10, p.2360-2369, 2003.

KALIRAI, H.; DODSON, A.; FAQIR, S.; DAMATO, B.E.; COUPLAND, S.E. Lack of BAP1 protein expression in uveal melanoma is associated with increased metastatic risk and has utility in routine prognostic testing. *Br. J. Cancer*, v.111, n.7, p.1373-1380, 2014.

KALISHMAN, J.B.; CHAPPELL, R.; FLOOD, L.A.; DUBIELZIG, R.R. A matched observational study of survival in cats with enucleation due to diffuse iris melanoma. *Vet. Ophthalmol.*, v.1, n.1, p.25-29, 1998.

KIRCHER, C.H.; GARNER, F.M.; ROBINSON, F.R. X: Tumours of the eye and adnexa. *Bull. Wld Hlth Org.*, v.50, p.135-142, 1974.

KOOPMANS, A.E.; VERDIJK, R.M.; BROUWER, R.W.W.; VAN DEN BOSCH, T.P.P.; VAN DEN BERG, M.M.P.; VAARWATER, J.; KOCKX, C.E.M.; PARIDAENS, D.; NAUS, N.C.; NELLIST, M.; VAN IJCKEN, W.F.J.; KILIC, E.; DE KLEIN, A. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod. Pathol.*, v.27, n.10, p.1321-1330, 2014.

LAVRIK, I.N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J. Clin. Invest.*, v.115, n.10, p.2665-2672, 2005.

LI, G.; HERLYN, M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today*, v.6, n.4, p.163-169, 2000.

LUNA, L.G. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.

MACHIDA, Y.J.; MACHIDA, Y.; VASHISHT, A.A.; WOHLSCHLEGEL, J.A.; DUTTA, A. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *J. Biol. Chem.*, v.284, n.49, p.34179-34188, 2009.

MARTINS, T.B.; BARROS, C.S.L. Fifty years in the blink of an eye: a retrospective study of ocular and periocular lesions in domestic animals. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, n.12, p.1215-1222, 2014.

MCGEADY, T.A.; QUINN, P.J.; FITZPATRICK, E.S.; RYAN, M.T. *Veterinary embryology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p.154-156, 295-300, 313.

MILLER, P.E. Uvea. In: MAGGS, D.J.; MILLER, P.E.; OFRI, R. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4 ed. Missouri: Elsevier, 2008. p.225-226.

MISAGHI, S.; OTTOSEN, S.; IZRAEL-TOMASEVIC, A.; ARNOTT, D.; LAMKANFI, M.; LEE, J.; LIU, J.; O'ROURKE, K.; DIXIT, V.M.; WILSON, A.C. Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, v.29, n.8, p.2181-2192, 2009.

MODIANO, F.; RITT, M.G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J. Vet. Intern. Med.*, v.13, n.3, p.163-174, 1999.

MONTOLIU, P.; AÑOR, S.; VIDAL, E.; PUMAROLA, M. Histological and Immunohistochemical Study of 30 Cases of Canine Meningioma. *J. Comp. Pathol.*, v.135, p.200-207, 2006.

MOREIRA, M.V.L.; TEIXEIRA NETO, R.L.A.L.; LANGOHR, I.M.; ECCO, R. Prospective study of ocular and periocular diseases in animals: 188 cases. *Pesq. Vet. Bras.*, v.38, n.3, p.502-510, 2018.

MURALI, R.; WIESNER, T.; SCOLYER, R.A. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology*, v.45, n.2, p.116-126, 2013.

NISHIKAWA, H.; WU, W.; KOIKE, A.; KOJIMA, R.; GOMI, H.; FUKUDA, M.; OHTA, T. BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res.*, v.69, n.1, p.111-119, 2009.

NJAUW, C-N. J.; KIM, I.; PIRIS, A.; GABREE, M.; TAYLOR, M.; LANE, A.M.; DEANGELIS, M.M.; GRAGOUDAS, E.; DUNCAN, L.M.; TSAO, H. Germline BAP1 Inactivation Is Preferentially Associated with Metastatic Ocular Melanoma and Cutaneous-Ocular Melanoma Families. *Plos One*, v.7, n.4, e35295, 2012.

ONKEN, M.D.; EHLERS, J.P.; WORLEY, L.A.; MAKITA, J.; YOKOTA, Y.; HARBOUR, J.W. Functional Gene Expression Analysis Uncovers Phenotypic Switch in Aggressive Uveal Melanomas. *Cancer Res.*, v.66, n.9, p.4602-4609, 2006.

PATNAIK, A.K.; MOONEY, S. Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. *Vet. Pathol.*, v.25, n.2, p.105-112, 1988.

PROUTEAU, A.; ANDRÉ, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes*, v.10, n.7, p.1-20, 2019.

RAMOS-VARA, J.A.; MILLER, M.A. Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. *Vet. Pathol.*, v.48, p.443-450, 2011.

RAVISHANKAR, S.; NAGARAJAN, P.; CURRY, J.L.; TETZLAFF, M.T.; IVAN, D.; TORRES-CABALA, C.A.; AUNG, P.P.; PRIETO, V.G. Giemsa is the optimal counterstain for immunohistochemical detection of BRAF V600E mutation status in pigmented melanomas. *J. Cutan. Pathol.*, v.43, n.8, p.722-724, 2016.

ROCHAIX, P.; LACROIX-TRIKI, M.; LAMANT, L.; PICHEREAUX, C.; VALMARY, S.; PUENTE, E.; AL SAATI, T.; MONSARRAT, B.; SUSINI, C.; BUSCAIL, L.; DELSOL, G.; VOIGT, J-J. PNL2, a New Monoclonal Antibody Directed against a Fixative-Resistant Melanocyte Antigen. *Mod. Pathol.*, v.16, n.5, p.481-490, 2003.



ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PNCa and Ki67 proliferations markers as criteria for prediction of clinical behavior of melanocytic tumours in cats and dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.121, p.13-24, 1999.

SAELENS, X.; FESTJENS, N.; VANDE WALLE, L.; VAN GURP, M.; VAN LOO, G.; VANDENABEELE, P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, v.23, n.16, p.2861-2874, 2004.

SHAH, A.A.; BOURNE, T.D.; MURALI, R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. *Pathology*, v.45, n.7, p.651-656, 2013.

SIMPSON, R.M.; BASTIAN, B.C.; MICHAEL, H.T.; WEBSTER, J.D.; PRASAD, M.L.; CONWAY, C.M.; PRIETO, V.M.; GARY, J.M.; GOLDSCHMIDT, M.H.; ESPLIN, D.G.; SMEDLEY, R.C.; PIRIS, A.; MEUTEN, D.J.; KIUPEL, M.; LEE, C.C.; WARD, J.M.; DWYER, J.E.; DAVIS, B.J.; ANVER, M.R.; MOLINOLO, A.A.; HOOVER, S.B.; RODRIGUEZ-CANALES, J.; HEWITT, S.M. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a pre-clinical model for human melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Res.*, v.27, n.1, p.37-47, 2013.

SMEDLEY, R.C.; SPANGLER, W.L.; ESPLIN, D.G.; KITCHELL, B.E.; BERGMAN, P.J.; HO, H.-Y.; BERGIN, I.L.; KIUPEL, M. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms: A Comparative Review of the Literature and Goals for Future Investigation. *Vet. Pathol.*, v.48, n.1, p. 54-72, 2011.

SMITH, S.H.; GOLDSCHMIDT, M.H.; MCMANUS, P.M. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. *Vet. Pathol.*, v.39, n.6, p.651-678, 2002.

SOENGAS, M.S.; LOWE, S.W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, v.22, n.20, p.3138-3151, 2003.

SPANGLER, W.L.; KASS, P.H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet. Pathol.*, v.43, n.2, p.136-149, 2006.

STAUNTON, M.J.; GAFFNEY, E.F. Tumor Type Is a Determinant of Susceptibility to Apoptosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.103, n.3, p.300-307, 1995.

STEFANOVIC', D.; STEFANOVIC', M.; NIKIN, Z. Romanowsky-Giemsa as a counterstain for immunohistochemistry: optimizing a traditional reagent. *Biotech. Histochem.*, v.88, n.6, p.329-335, 2013.

TURNER, S.M. Oftalmologia em pequenos animais. In: NIND, F. *Série clínica veterinária na prática*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 370p.

van der WEYDEN, L.; PATTON, E.E.; 2 WOOD, G.A.; FOOTE, A.K.; BRENN, T.; ARENDS, M.J.; ADAMS, D.J. Cross-species models of human melanoma. *J. Pathol.*, v.238, p.152-165, 2016.

VENTII, K.H.; DEVI, N.S.; FRIEDRICH, K.L.; CHERNOVA, T.A.; TIGHIOUART, M.; VAN MEIR, E.G.; WILKINSON, K.D. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that

requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res.*, v.68, n.17, p.6953-6962, 2008.

VERDIJK, R.M.; BOSCH, T.V.D; NAUS, N.C.; PARIDAENS, D.; MOOY, C.M.; KLEIN, A. Histopathologic, Immunohistochemical, Ultrastructural, and Cytogenetic Analysis of Oncocytic Uveal Melanoma. *Arch. Ophthalmol.*, v.129, n.11, p.1501-1502, 2011.

WEINSTEIN, D.; LEININGER, J.; HAMBY, C.; SAFAI, B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, v.7, n.6, p.13-24, 2014.

WIESNER, T.; OBENAUF, A.C.; MURALI, R.; FRIED, I.; GRIEWANK, K.G.; ULZ, P.; WINDPASSINGER, C.; WACKERNAGEL, W.; LOY, S.; WOLF, I.; VIALE, A.; LASH, A.E.; PIRUN, M.; SOCCI, N.D.; RÜTTEN, A.; PALMEDO, G.; ABRAMSON, D.; OFFIT, K.; OTT, A.; BECKER, J.C.; CERRONI, L.; KUTZNER, H.; BASTIAN, B.C.; SPEICHER, M.R. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat. Genet.*, v.43, n.10, p.1018-1022, 2011.

WIGGANS, K.T.; REILLY, C.M.; KASS, P.H.; MAGGS, D.J. Histologic and immunohistochemical predictors of clinical behavior for feline diffuse iris melanoma. *Vet. Ophthalmol.*, v.19, n.1, p.44-55, 2016.

WILCOCK, B.P.; NJAA, B.L. Special Senses. MAXIE M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals*. 6 ed., vol. 1. Missouri: Elsevier, 2016. p.407-508.

WILCOCK, B.P.; PEIFFER, R.L. Morphology and Behavior of Primary Ocular Melanomas in 91 Dogs. *Vet. Pathol.*, v.23, n.4, p.418-424, 1986.

YU, H.; MASHTALIR, N.; DAOU, S.; HAMMOND-MARTEL, I.; ROSS, J.; SUI, G.; HART, G.W.; RAUSCHER, F.J.3RD.; DROBETSKY, E.; MILOT, E.; SHI, Y.; AFFAR, EL.B. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression *Mol. Cell. Biol.*, v.30, n.21, p.5071-5085, 2010.

## 10. ANEXO 1

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG.



**UFMG**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 262 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Aspectos macroscópicos, histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares das patologias oculares em animais", que tem como responsável Roselene Ecco, 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 23/10/2014. Este certificado espira-se em 23/10/2019.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 262 / 2014, related to the Project entitled "Macroscopic, histopathological, immunohistochemical and molecular aspects of ocular pathology in animals", under the supervision of Roselene Ecco, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 23/10/2014. This certificate expires in 23/10/2019.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
Belo Horizonte, 23/10/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)