

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Patologia

Thacyana Beatriz Guimarães Lopes

**ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL SOB O
COMPORTAMENTO METASTÁTICO E CARÁTER PROGNÓSTICO EM
MELANOMAS CANINOS**

Belo Horizonte

2024

Thacyana Beatriz Guimarães Lopes

**ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL SOB O
COMPORTAMENTO METASTÁTICO E CARÁTER PROGNÓSTICO EM
MELANOMAS CANINOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre (a) em Patologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Enio Ferreira

Belo Horizonte

2024

043

Lopes, Thacyana Beatriz Guimarães.

Análise da transição epitelial-mesenquimal sob o comportamento metastático e caráter prognóstico em melanomas caninos [manuscrito] / Thacyana Beatriz Guimarães Lopes. – 2024.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador (a): Prof. Dr. Enio Ferreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Melanoma. 3. Cães. 4. Transição Epitelial-Mesenquimal. 5. Caderinas. I. Ferreira, Enio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - SECRETARIA

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 486 DE THACYANA BEATRIZ
GUIMARÃES LOPES**

Realizou-se, no dia 26 de julho de 2024, às 14 horas, no formato on-line, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada “**Análise da Transição Epitelial-Mesenquimal sob o Comportamento Metastático e Caráter Prognóstico em Melanomas Caninos**”, apresentada por **Thacyana Beatriz Guimarães Lopes** número de registro 20226912223, graduada no curso de Biomedicina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Camila Pereira Almeida**, Royal Marsden Hospital/Inglaterra; **Prof. Dr. Emerson Soares Veloso**, Instituto Hermes Pardini – BH/MG; **Prof. Dr. Enio Ferreira** – ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Dissertação:

APROVADA
 REPROVADA

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

Belo Horizonte, 26 de julho de 2024.

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



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 26/07/2024, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Pereira Almeida, Usuária Externa**, em 31/07/2024, às 12:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emerson Soares Veloso, Usuário Externo**, em 01/08/2024, às 21:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL SOB O COMPORTAMENTO METASTÁTICO E CARÁTER PROGNÓSTICO EM MELANOMAS CANINOS”

THACYANA BEATRIZ GUIMARÃES LOPES

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

Aprovada em 26 de julho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Dra. Camila Pereira Almeida, Royal Marsden Hospital/Inglaterra

Prof. Dr. Emerson Soares Veloso, Instituto Hermes Pardini – BH/MG

Prof. Dr. Enio Ferreira – ICB/UFMG - ORIENTADOR

Belo Horizonte, 26 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Enio Ferreira, Professor do Magistério Superior**, em 26/07/2024, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Camila Pereira Almeida, Usuária Externa**, em 31/07/2024, às 12:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emerson Soares Veloso, Usuário Externo**, em 01/08/2024, às 21:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3400169** e o código CRC **83277BC2**.

*Ao meu pai, que os olhos brilham sempre
que me pergunta como vão meus
estudos, e a minha mãe, que me ensinou
a sempre lutar pelos meus sonhos,
espero encher vocês de orgulho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder força e sabedoria durante esta importante fase da minha vida e por guiar meus passos ao lado de pessoas incríveis que Ele colocou em meu caminho. Sem Ele, nada disso seria possível.

Expresso minha profunda gratidão à minha família, especialmente à minha mãe e meu pai, pelo apoio incondicional e pelo incentivo constante ao longo dessa jornada.

Ao meu noivo, meu sincero agradecimento por toda ajuda durante este período, me ouvindo pacientemente falar sobre meu projeto, oferecendo apoio e me encorajando quando mais precisei.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Prof. Enio Ferreira, por sua orientação, seus conselhos e por me ouvir nos momentos difíceis. Obrigada pela confiança depositada em mim.

Agradeço também à Dai, que não apenas compartilhou os desafios do projeto comigo, mas também boas conversas e cafés. Obrigada pelas boas risadas e por sua amizade.

À Leticia, que esteve presente nesta fase final, compartilhando dos surtos, de boas risadas e conhecimento comigo, meu sincero agradecimento.

Agradeço a Ana, por toda ajuda e conhecimento compartilhado, por estar presente na minha vida desde o estágio que fizemos na graduação.

Agradeço aos meus primos, Barbara, Thauber e Thauler, por acreditarem em mim e estarem ao meu lado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório e do programa, Bruna, Diego, Emanuelle, Deborah, Eduardo e Isadora.

Agradeço ao Emerson, por toda ajuda e paciência durante meu período no mestrado, tirando um tempo para esclarecer pacientemente minhas dúvidas, muito obrigada.

Agradeço aos meus colegas que já passaram pelo laboratório e programa, Barbara e Bruna, obrigada por toda troca de conhecimento e colaboração.

É uma verdadeira honra fazer parte do Programa de Pós-Graduação em Patologia, e por isso, agradeço a toda equipe envolvida.

Por fim, agradeço aos membros da banca por dedicarem seu tempo e contribuírem com suas preciosas avaliações.

Meus sinceros e profundos agradecimentos a todos que de alguma forma fizeram parte deste caminho.

RESUMO

Os tumores melanocíticos representam cerca de 7% das neoplasias malignas em cães e têm um prognóstico ruim devido à alta incidência de metástase, afetando principalmente a cavidade oral, pele e regiões mucocutâneas. Diferentes estudos demonstram que a progressão dos melanomas pode estar relacionada a alterações na adesão celular, especialmente no processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), contudo sua relação direta com a formação metastática e sobrevida dos animais ainda é incerta. Assim, o presente estudo avaliou a expressão das proteínas E-caderina e N-caderina, envolvidas na TEM, em melanomas caninos e seus linfonodos metastáticos e a relação dessa expressão com o tempo de sobrevida dos animais. Foram selecionados 32 casos de melanomas caninos e seus respectivos linfonodos. Foi feita uma avaliação histopatológica para caracterização do tumor e realizada a técnica de imuno-histoquímica para Melan-A, PNL-2, E-caderina e N-caderina, tanto nos tumores primários quanto nas metástases linfáticas. Dos casos analisados, 47% eram não metastáticos e 53% metastáticos, com alta expressão de E-caderina em ambos, enquanto a N-caderina apresentou variação significativa entre os grupos, apresentando uma maior expressão nos tumores metastáticos. Tumores com alta expressão de E-caderina e N-caderina apresentaram associação a características histológicas de agressividade tumoral e com um pior prognóstico dos animais. Os dados obtidos sustentam a hipótese da possibilidade do papel da TEM na progressão dos melanomas caninos.

Palavras chaves: Melanoma, cão, transição epitelial-mesenquimal, E-Caderina, N-Caderina.

ABSTRACT

Melanocytic tumors represent about 7% of malignant neoplasms in dogs and have a poor prognosis due to the high incidence of metastasis, mainly affecting the oral cavity, skin, and mucocutaneous regions. Various studies demonstrate that the progression of melanomas may be related to changes in cell adhesion, especially in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT); however, its direct relationship with metastatic formation and animal survival remains uncertain. Thus, the present study evaluated the expression of the proteins E-cadherin and N-cadherin, involved in EMT, in canine melanomas and their metastatic lymph nodes, and the relationship of this expression with the survival time of the animals. Thirty-two cases of canine melanomas and their respective lymph nodes were selected. A histopathological evaluation was performed for tumor characterization, and the immunohistochemistry was applied for Melan-A, PNL-2, E-cadherin, and N-cadherin, both in primary tumors and in lymphatic metastases. Among the cases analyzed, 47% were non-metastatic, and 53% were metastatic, with high E-cadherin expression in both groups. In contrast, N-cadherin showed significant variation between groups, with higher expression in metastatic tumors. Tumors with high E-cadherin and N-cadherin expression were associated with histological features of tumor aggressiveness and poorer animal prognosis. The data obtained support the hypothesis of a potential role for EMT in canine melanoma progression.

Keywords: Melanoma, dog, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, N-cadherin.

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizados no estudo imuno-histoquímico.....	30
Tabela II- Características histopatológicas dos tumores primários usados no estudo.....	31
Tabela III- Características histopatológicas dos casos não metastáticos usados no estudo.....	43
Tabela IV- Características histopatológicas dos casos metastáticos usados no estudo.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases da Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM).....	25
Figura 2. Apresentação da frequência pigmentação em melanomas orais e cutâneos, metastáticos e não metastáticos.....	33
Figura 3. Tipo histológico predominante em melanomas orais e cutâneos, metastáticos e não metastáticos.....	34
Figura 4. Apresentação da frequência de êmbolos nos tumores metastáticos e não metastáticos, conforme a localização.....	35
Figura 5. Apresentação da frequência de Ulceração em Melanomas Oraís e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos.....	36
Figura 6. Apresentação da frequência de necrose em Melanomas Oraís e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos.....	37
Figura 7. Apresentação da frequência de Desmoplasia em Melanomas Oraís e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos.....	38
Figura 8. Imuno-histoquímica de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários e seus respectivos linfonodos regionais metastáticos.....	39
Figura 9. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos.....	40
Figura 10. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, reclassificado em <50% e >50% de expressão.....	40
Figura 11. Frequência de expressão de N-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos.....	41
Figura 12. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, reclassificado em <50% e >50% de expressão.....	42
Figura 13. Análise da pigmentação e expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores.....	44

Figura 14. Análise do tipo histológico predominante nos tumores, de acordo com a expressão de E-Caderina e N-Caderina.....	46
Figura 15. Análise da presença de êmbolos neoplásicos em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina.....	47
Figura 16. Análise da presença de úlceras em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	48
Figura 17. Análise da presença de necrose em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em células neoplásicas.....	49
Figura 18. Análise da presença de desmoplasia em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em células neoplásicas.....	50
Figura 19. Análise da pigmentação em tumores metastáticos em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina.....	52
Figura 20. Análise do tipo histológico predominante em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	53
Figura 21. Análise da presença de êmbolo em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	54
Figura 22. Análise da presença de ulcera em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	55
Figura 23. Análise da presença de necrose em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	56
Figura 24. Análise da presença de desmoplasia em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores.....	57
Figura 25. Comparação do tempo de sobrevida em animais com melanomas metastáticos e não metastáticos.....	58
Figura 26. Comparação do tempo de sobrevida em animais com tumores pigmentados e amelanóticos, categorizados pelos escores de pigmentação.....	59
Figura 27. Comparação do tempo de sobrevida em animais com tumores classificados por tipo histológico.....	59

Figura 28. Comparação do tempo de sobrevida em animais com presença de êmbolos neoplásicos.....	60
Figura 29. Comparação do tempo de sobrevida em animais com e sem desmoplasia.....	61
Figura 30. Comparação do tempo de sobrevida em tumores primários baseada na expressão de E-Caderina e N-Caderina.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA-UFMG- Comissão de ética no uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais

CNPQ- Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico

DNA- Ácido desoxirribonucleico

LCC- Laboratório do comportamento celular

MEC- Matriz extra celular

TEM- Transição epitelial-mesenquimal

TME- Transição mesenquimal-epitelial

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1. O melanócito	18
2.2. O melanoma humano	19
2.3. O melanoma canino	21
2.4. A Transição Epitelial-Mesenquimal.....	23
2.4.1. Aspectos moleculares da Transição Epitelial-Mesenquimal em Neoplasias ...	26
3. OBJETIVO.....	28
3.1. Objetivos Específicos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Aspectos Éticos	28
4.2. Espécimes.....	28
4.3. Avaliação Histopatológica.....	29
4.4. Imuno-Histoquímica.....	29
4.5. Interpretação da Imuno-Histoquímica	30
4.6. Análise de Sobrevida.....	31
4.7. Análise Estatística	31
5. RESULTADOS.....	31
5.1. Aspectos histopatológicos dos melanomas caninos orais e cutâneos.	31
5.2. Expressão de E-Caderina e N-caderina em melanomas metastáticos e não metastáticos.....	38
5.3. Correlação entre as expressões de E-Caderina e N-Caderina em melanomas caninos e seus linfonodos metastáticos.	42
5.4. Relação dos aspectos histopatológicos com a expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários não metastáticos.....	43
5.5. Relação dos aspectos histopatológicos com a expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários metastáticos.....	50
5.6. Sobrevida	57
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS.....	68
____ Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	73
____ Anexo II. Manuscrito de artigo científico submetido para publicação	75

1. INTRODUÇÃO

Tumores melanocíticos representam cerca de 7% de todas as neoplasias malignas em cães (Colombo *et al.*, 2022;). Aliado a isso, apresentam-se como um tipo de câncer com pior prognóstico devido sua alta incidência de metástase, acometendo a cavidade oral, cutânea, região sublingual e junções mucocutâneas (Gillard *et al.*, 2014; Barreto *et al.*, 2017; Prouteau & André, 2019). A localização dos tumores pode oferecer uma oportunidade para diagnóstico precoce, como é o caso dos melanomas cutâneos, que podem ser detectados em fases iniciais. Em contraste, melanomas orais em cães frequentemente são diagnosticados tardiamente e, exibem uma prevalência de metástases pulmonares variando de 17% a 51% (Prouteau & André, 2019). Aliado a isso, é reconhecido que a maioria das mortes por câncer está associada às consequências da lesão metastática (Chiang & Massagué, 2008; Medeiros *et al.*, 2018).

Como em diversos tipos de cânceres, a invasão e propagação de melanomas estão relacionadas a alterações na adesão celular, contribuindo significativamente para a invasão tumoral, interações tumor-estroma e sinalização das células tumorais (Miller *et al.*, 2006). Essa progressão tumoral está associada ao processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), que é um importante evento na disseminação de neoplasias (Pedri *et al.*, 2021).

A Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM) se caracteriza pela transformação do fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal, nas células neoplásicas. Este processo é marcado pela alteração no perfil de expressão de caderinas pelas células neoplásicas. Consequentemente, essas células perdem a expressão de marcadores epeliais de adesão, como a E-Caderina, enquanto ganham a expressão de marcadores mesenquimais, como a N-Caderina (Medeiros *et al.*, 2018). Isso resulta no fenótipo de célula mesenquimal, conferindo a essas células uma maior capacidade migratória, elevada resistência à apoptose e produção de componentes da matriz extracelular (MEC) (Veloso *et al.*, 2020; Pedri *et al.*, 2021).

Os melanócitos na camada basal da epiderme normalmente expressam E-Caderina, regulando a interação com os queratinócitos e prevenindo a proliferação descontrolada. Entretanto, os melanócitos neoplásicos podem perder a expressão de E-Caderina e adotar um perfil mesenquimal através da TEM. Este perfil mesenquimal

adquirido pelas células neoplásicas, está intimamente relacionado a invasão tumoral e a formação de metastase, uma vez que estas células perdem a interação com queratinócitos além de favorecer a sua adesão a fibroblastos e proteínas da matriz (MEC). (Cao et al., 2019; Silvestri et al., 2020). Por outro lado, a N-caderina, também conhecida como proteína CDH2, é uma proteína transmembrana essencial no desenvolvimento embrionário, especialmente em tecidos nervosos, cérebro, coração e outros órgãos. Em mamíferos adultos, sua expressão é limitada a tecidos nervosos, fibroblastos e células mesodérmicas. Apesar de ser normalmente expressa em níveis baixos em outros tipos celulares normais, sua elevação fora dos tecidos nervosos está ligada à progressão tumoral, conferindo às células neoplásicas características mesenquimais e facilitando a migração para locais distantes (Cao *et al.*, 2019).

Apesar de ser reconhecido o fenômeno da TEM em diferentes tumores caninos e humanos, inclusive em melanomas, ainda é incerto a compreensão do seu comportamento durante a progressão dos melanomas caninos e sua relação com o prognóstico dos animais acometidos. Desta forma, o presente trabalho busca avaliar a expressão das proteínas envolvidas na TEM em melanomas primários e seus respectivos linfonodos metastáticos, com o objetivo de elucidar os mecanismos presentes na progressão tumoral do melanoma canino e sua relação com o tempo de sobrevida desses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O melanócito

Os melanócitos são células especializadas originadas das células da crista neural, especificamente dos melanoblastos. Esses melanoblastos migram para diferentes destinos através do tronco da crista neural, incluindo a camada basal da epiderme e os folículos pilosos. Outros melanoblastos migram para locais como a área ao redor dos olhos e a estria vascular no ouvido interno (Oliveira & Junior, 2003; Darío & Jairo, 2015; Tang & Victoria, 2019).

A principal função dos melanócitos é a produção do pigmento melânico através do processo químico chamado melanogênese, proporcionando assim proteção aos queratinócitos na pele contra danos ao DNA (Aris, 2009; Videria, Moura & Magina,

2013; Darío & Jairo, 2015; Tang & Victoria, 2019). A melanogênese ocorre dentro de compartimentos citoplasmáticos chamados melanossomos. Estes são transferidos do local de síntese para a região perinuclear dos melanócitos e, em seguida, para as pontas de seus dendritos. Posteriormente, os melanossomos são transferidos para os queratinócitos, migrando para o núcleo e protegendo-o da radiação UV (Oliveira & Junior, 2003; Miot *et al.*, 2009). As células da crista neural surgem no neuroectoderma e se preparam para migrar através do processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM) pela via dorsolateral em direção à linha ventral média. Em mamíferos, essas células invadem a camada basal da epiderme e passam pelo processo de transição mesenquimal-epitelial (TME). Uma vez na epiderme, elas proliferam extensivamente e se diferenciam em melanócitos maduros após estimulação pelos queratinócitos (Oliveira & Junior, 2003; Darío & Jairo, 2015; Benedetti & Reis, 2015; Debnath & Huirem & Dutta, 2021).

Os melanócitos são células com citoplasma globuloso localizadas na camada basal da epiderme, com processos dendríticos que se projetam para a camada espinhosa (Miot *et al.*, 2009). Através desses dendritos, os melanócitos interagem com os queratinócitos presentes na pele. Os melanócitos foliculares, maiores e com dendritos mais longos, estão relacionados a apenas 4 a 5 queratinócitos, em contraste com os 36 a 40 queratinócitos associados aos melanócitos epidérmicos (Oliveira & Junior, 2003).

A interação entre queratinócitos e melanócitos, é responsável por regular a proliferação dos melanócitos, sendo mediada principalmente pela E-caderina, uma proteína de adesão célula-célula expressa em condições fisiológicas por ambas as células. Em condições neoplásicas, essa interação é frequentemente interrompida devido à redução da expressão da E-caderina e ao aumento da expressão da N-caderina, o que confere às células neoplásicas um perfil mesenquimal (Silvestri *et al.*, 2020).

2.2. O melanoma humano

O melanoma é um tipo de câncer de pele originado da transformação neoplásica dos melanócitos. É o tipo de câncer de pele mais agressivo e potencialmente letal, representando uma pequena porcentagem dos casos de câncer de pele, mas a

maioria das mortes relacionadas a neoplasias no órgão. A incidência de melanoma tem aumentado globalmente, tornando-se um problema significativo de saúde pública (Miller & Mihm, 2006; Schadendorf *et al.*, 2015)

É uma neoplasia mais comum em populações de pele clara tendo uma maior incidência em regiões com alta exposição solar, como a Austrália e a Nova Zelândia (Garbe & Leiter, 2009; Ma *et al.*, 2023). No Brasil representa cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, representando 4% das neoplasias malignas que atingem a pele, sendo considerado o tipo mais grave devido sua alta capacidade de metastizar para sítios distantes, sendo está a causa de cerca de 90% das mortes dos pacientes com esta doença (Guan, 2015; Inca, 2022; Gupta & Janostiak & Wajapeyee, 2020). Fatores de risco incluem exposição à radiação ultravioleta (UV), histórico familiar de melanoma, e a presença de nevos displásicos na pele (Gandini *et al.*, 2005).

A avaliação precisa da profundidade de invasão do melanoma é crucial para determinar o estágio da doença e para orientar as decisões terapêuticas. Em 1969, Clark e colaboradores desenvolveram um sistema de classificação que divide o melanoma em cinco estágios (I a V), baseados na profundidade de penetração das células cancerígenas na pele. Níveis mais baixos (I e II) geralmente indicam um melanoma superficial, com melhores taxas de sobrevida e menor probabilidade de disseminação metastática, enquanto níveis mais altos (III, IV e V) estão associados a uma invasão mais profunda e maior risco de recorrência e metástases, sendo definidos de acordo com as camadas da pele acometidas pela lesão sendo: nível I: crescimento intraepidérmico; nível II: invasão da derme papilar; nível III: comprometimento da junção derme papilar e derme reticular; nível IV: invasão da derme reticular; e nível V: invasão do tecido subcutâneo (Clark *et al.*, 1969).

Além da classificação de Clark, outro parâmetro crucial é o índice de Breslow, que mede a espessura do melanoma em milímetros, da camada granulosa da epiderme até a célula cancerígena mais profunda (Breslow *et al.*, 1970).

Para avaliação prognóstica mais detalhada, o sistema TNM (Tumor, nódulos regionais, Metástase à distância) é frequentemente utilizado, fornecendo informações sobre o tamanho do tumor (T), metástase nos linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), o que é essencial para o manejo clínico e a previsão do

prognóstico dos pacientes com melanoma. Foi determinado pelo *American Joint Committee on Cancer*, que o tamanho da neoplasia (T) deve ser classificado em T1 se < ou igual a 1mm; T2 se 1,01 a 2,00mm; 3 se 2,01 a 4,00mm e T4 se >4mm, existindo ainda subcategorias determinadas pela a: ausência ou b: presença de ulceração (Balch *et al.*, 2009; Wisco & Sober, 2012).

O acometimento dos linfonodos regionais por nódulos neoplásicos (N) é classificado quanto ao número de nódulos metastáticos presentes neste linfonodo, sendo N0: ausência de nódulos; N1: 1 nódulo; N2: 2 a 3 nódulos; N3 > ou igual a 4 nódulos metastáticos, existindo ainda subcategorias determinadas pela a: micrometástase e b: macrometástase (Balch *et al.*, 2009; Wisco & Sober, 2012).

Já as metástases a distância (M) são classificadas quanto a sua ausência (M0); M1a: metástases cutâneas, subcutâneas ou ganglionares distantes; M1b: metástases pulmonares; e M1c: metástases no sistema nervoso central (Balch *et al.*, 2009; Wisco & Sober, 2012).

Outros critérios utilizados para avaliação prognóstica em melanomas é o uso do marcador Ki-67 e a contagem do índice mitótico para análise da proliferação celular. O Ki-67 é uma proteína nuclear que está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular, mas ausente nas células em fase G0 (células quiescentes) (Menon, *et al.*, 2019; Scholzen, *et al.*, 2000; Li, *et al.*, 2014). A contagem do índice mitótico também reflete um pior prognóstico, onde tumores com um alto índice mitótico são considerados mais agressivos e tem um maior potencial de crescimento rápido e sofrer metastase (Nardi *et al.*, 2022).

2.3. O melanoma canino

Neoplasias melanocíticas são comumente diagnosticadas em cães, representando cerca de 7% de todas as neoplasias malignas que afetam essa espécie. Estes tumores são frequentemente encontrados na cavidade oral, especialmente na gengiva, e também podem ocorrer no epitélio lingual, bucal, faríngeo, tonsilar e palatino. O melanoma é considerado a malignidade oral mais prevalente em cães (Smedley *et al.*, 2011; Polton *et al.*, 2024).

Os melanomas caninos ocorrem em locais semelhantes aos encontrados em humanos, como pele, mucosas, matriz ungueal e olhos (Gillard et al., 2014). Compartilham características clínicas, histopatológicas e moleculares com o melanoma humano, tornando-se um excelente modelo pré-clínicos (Simpson et al., 2014). Ao contrário de modelos animais como o murino, que requerem indução neoplásica e, por vezes, imunossupressão, os melanomas caninos são espontâneos em animais imunocompetentes, destacando-se como um modelo valioso para estudos comparativos com melanomas humanos (Hernandez et al., 2018).

Entretanto, ao contrário do melanoma cutâneo humano, cuja exposição à luz UV e a pele clara são fatores etiológicos bem estabelecidos, a etiologia do melanoma canino permanece obscura e envolve múltiplos fatores como consanguinidade, trauma, fatores genéticos, entre outros (Nishiya *et al.*, 2016; Proteau & Andre, 2019). Certas raças caninas, como pinscher, poodle, cocker spaniel, rottweiler e chow-chow, apresentam uma predisposição para o desenvolvimento de melanoma canino (Velo *et al.*, 2020).

Para a análise histopatológica do melanoma, utiliza-se o consenso estabelecido por Smedley e colaboradores, que avalia características como pigmentação, ulceração, necrose, desmoplasia, atipia nuclear e presença de metástases (Smedley *et al.*, 2011).

Além da análise histopatológica é avaliado o estadiamento clínico de acordo com a Organização Mundial de Saúde, este avalia três critérios: Segmento T: tamanho e extensão local do tumor primário; Segmento N: Linfonodos regionais com nódulos metastáticos; e Segmento M: Presença de metastase a distância, principalmente nos pulmões (Polton *et al.*, 2024).

A confirmação diagnóstica é necessária através da técnica de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo anti-Melan-A, que reconhece a proteína Melan-A expressa pelos melanócitos, e para os casos amelanóticos ou negativos para o anti-Melan-A, é utilizado o Melanoma Antigen, mais conhecido como PNL-2.

Sabe-se que o melanoma canino é uma neoplasia altamente agressiva com baixas taxas de sobrevida devido sua alta capacidade de metastatizar para sítios distantes

(Chiang & Massagué, 2008; Medeiros *et al.*, 2018). Como em diversos tipos de cânceres, a invasão e propagação de melanomas estão relacionadas a alterações na adesão celular, contribuindo significativamente para a invasão tumoral, interações tumor-estroma e sinalização das células tumorais (Miller *et al.*, 2006). Essa progressão tumoral está associada ao processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), que é um importante evento na disseminação de neoplasias (Pedri *et al.*, 2021).

Em melanomas caninos a análise de fatores prognósticos, como a contagem do índice mitótico, é crucial para determinar o grau de agressividade do tumor. Onde quanto maior o índice mitótico, geralmente mais agressivo e rápido é o crescimento do melanoma.

Além da avaliação do índice mitótico também é avaliado a expressão da proteína Ki-67, onde a medição da sua expressão em células tumorais fornece um índice de proliferação, indicando a proporção de células que estão ativamente se dividindo. Isso é crucial para avaliar a agressividade do tumor e prever o prognóstico. Estudos têm mostrado que uma alta expressão de Ki-67 está frequentemente correlacionada com um comportamento mais agressivo do melanoma canino, incluindo maior taxa de crescimento e maior potencial metastático (Schuler *et al.*, 2016).

A análise de Ki-67 é frequentemente utilizada junto a contagem do índice mitótico. Enquanto o índice mitótico conta diretamente as células em mitose, Ki-67 avalia a fração de células em divisão, proporcionando uma avaliação mais abrangente da atividade proliferativa do tumor (Smedley *et al.*, 2011; Gillard *et al.*, 2014).

2.4. A Transição Epitelial-Mesenquimal

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo biológico no qual células epiteliais polarizadas, que normalmente interagem com sua membrana basal, perdem sua organização e as junções intercelulares. Isso resulta na reprogramação da expressão genética e em múltiplas mudanças bioquímicas que as transformam em um fenótipo mesenquimal. Este novo estado inclui alterações nos programas de sinalização que afetam a forma e organização do citoesqueleto, aumentando assim a capacidade migratória, invasiva e a resistência à apoptose das células. Além disso,

há uma elevada produção de componentes da matriz extracelular. Nesse sentido, são descritos três subtipos de TEM (Benedetti & Reis, 2015; Pearman *et al.*, 2017; Tang & Durand & Caramel, 2020; Pedri *et al.*, 2021).

A TEM tipo 1, também conhecida como TEM primária, refere-se à transição que ocorre durante a fase embrionária. Neste processo, as células adquirem um fenótipo mesenquimal para participar de eventos críticos do desenvolvimento embrionário, como a migração celular durante a implantação, formação do embrião, gastrulação e desenvolvimento da crista neural. Posteriormente, essas células passam por um processo reverso, a transição mesenquimal-epitelial, para restaurar seu fenótipo epitelial (Benedetti & Reis, 2015; Debnath & Huiem & Dutta, 2021).

A TEM tipo 2 é observada durante respostas inflamatórias crônicas e processo de reparo tecidual, como cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e fibrose, levando as células a adquirir características semelhantes às de fibroblastos (Benedetti & Reis, 2015; Debnath & Huiem & Dutta, 2021).

A TEM tipo 3 é o fenômeno observado durante a progressão tumoral. Uma pequena população de células neoplásicas no sítio primário utiliza a TEM para adquirir motilidade e capacidade invasiva. Essas células se disseminam do local de origem, entram na circulação e migram para locais distantes, onde aderem através de um processo de transição mesenquimal-epitelial, readquirindo expressão de marcadores epiteliais (Benedetti & Reis, 2015; Debnath & Huiem & Dutta, 2021).

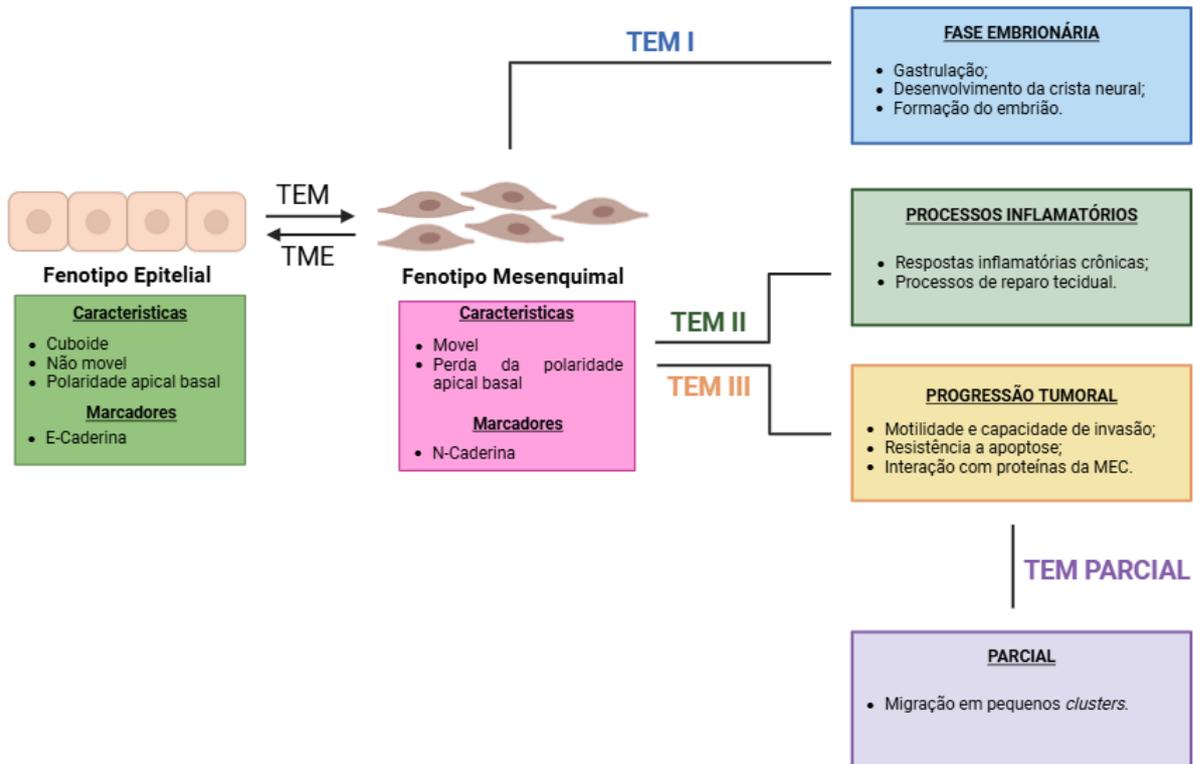


Figura 1. Fases da Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM). A TEM é um processo biológico pelo qual as células epiteliais perdem suas características de adesão e polaridade, adquirindo propriedades mesenquimais, como motilidade e capacidade de invasão. Classificada em tipos sendo: TEM tipo I: Ocorre durante o desenvolvimento embrionário, contribuindo para a formação de vários tecidos e órgãos; TEM tipo II: Associada à reparação tecidual e fibrose, esta fase é ativada em resposta a inflamações crônicas e lesões; TEM tipo III: Relacionada à progressão do câncer, onde as células tumorais adquirem características invasivas e metastáticas; TEM parcial: Uma etapa intermediária onde as células exibem tanto características epiteliais quanto mesenquimais, permitindo flexibilidade adaptativa durante a progressão tumoral.

A TEM não é simplesmente uma mudança de um estado completamente epitelial para um estado completamente mesenquimal, mas abrange um espectro de múltiplos estados intermediários. Esse processo é caracterizado por transições reversíveis que sustentam a plasticidade celular. Durante a TEM parcial, as células adquirem características mesenquimais, mas não perdem completamente suas propriedades epiteliais (Pedri *et al.*, 2021). No caso das células neoplásicas, estas iram migrar em pequenos *cluters*, o que quando comparado com as células que sofrem TEM completa, apresentam um maior risco de sofrer metástase (Grosse-Wilde *et al.*, 2015).

2.4.1. Aspectos moleculares da Transição Epitelial-Mesenquimal em Neoplasias

Durante a TEM tipo 3, ocorre uma alteração conhecida como "Cadherin Switch", onde há uma mudança nos perfis de caderinas expressas pelas células neoplásicas. Elas perdem a expressão de marcadores epiteliais, como a E-Caderina, e passam a expressar marcadores mesenquimais, como a N-Caderina (Hao et al., 2012; Pearlman et al., 2017).

As caderinas são uma família de glicoproteínas de superfície celular, caracterizadas por possuírem um domínio extracelular repetido e uma região citoplasmática que se liga não covalentemente ao citoesqueleto de actina através da associação com cateninas (p120-catenina, β -catenina e α -catenina). Elas formam o componente transmembrana das junções aderentes, facilitando adesões célula-célula dependentes de cálcio (Silvestri et al., 2020). Esta família inclui uma variedade de moléculas de adesão, como a E-Caderina, N-Caderina e P-Caderina, que desempenham papéis essenciais nos processos de desenvolvimento, como formação de tecidos e órgãos. A expressão dessas caderinas varia conforme o estágio de desenvolvimento e o tipo de tecido (Pierre & Marie 2002; Hazan et al., 2009; Cao et al., 2019; Silvestri et al., 2020).

A E-Caderina, também conhecida como proteína CDH1, é uma glicoproteína transmembrana crucial nas células epiteliais polarizadas. Ela desempenha um papel fundamental nos complexos caderina-catenina-citoesqueleto, conferindo propriedades anti-invasivas e anti-migratórias às células epiteliais. A perda de E-Caderina é crucial no processo de TEM (Kaufhold & Bonavida, 2014; Benedetti & Reis, 2015; Silvestri et al., 2020).

Normalmente, os melanócitos na camada basal da epiderme expressam E-Caderina, regulando a interação com os queratinócitos e prevenindo a proliferação descontrolada (Silvestri et al., 2020). Entretanto, os melanócitos neoplásicos podem perder a expressão de E-Caderina e adotar um perfil mesenquimal através da TEM (Veloso et al., 2020).

A N-caderina, também conhecida como CDH2, é uma proteína transmembrana de cadeia simples e um membro importante da família das caderinas (Debnath & Huiem

& Dutta, 2021; Pedri *et al.*, 2021). Amplamente expressa em embriões, desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e regulação de tecidos nervosos, cérebro, coração e outros órgãos. Em mamíferos maduros, sua expressão é restrita a tecidos nervosos, fibroblastos e células mesodérmicas. Normalmente, a N-caderina medeia a adesão intercelular em células neuronais, sendo expressa em níveis baixos em outros tipos celulares normais. No entanto, estudos indicam que sua expressão elevada em outros tecidos está associada à progressão tumoral, conferindo às células neoplásicas um perfil mesenquimal e facilitando suas capacidades migratórias, o que promove a migração para locais distantes (Derycke & Bracke, 2004; Cao *et al.*, 2019; Pedri *et al.*, 2021).

É descrita uma expressão aberrante de N-caderina em carcinomas espinocelulares, relacionada a uma diminuição na expressão de E-caderina, resultando em um perfil mais invasivo dessas células (Derycke & Bracke, 2004). João *et al.* (2011) observaram no carcinoma de células escamosas e nos tumores de células basais caninos uma redução da expressão de E-caderina e um perfil mais infiltrativo das células neoplásicas, o que conseqüentemente resultou em um pior prognóstico para cães com essas neoplasias.

Em outro estudo, foi observada uma co-expressão de E-caderina e N-caderina em um grande subconjunto de carcinomas de mama invasivos, sugerindo que a expressão elevada de N-caderina pode promover efeitos metastáticos mesmo na presença de E-caderina (Hazan *et al.*, 2009). Pedri *et al.*, 2021, observaram em células circulantes de melanoma um perfil semelhante, onde essas células neoplásicas migravam em pequenos *clusters*, mantendo tanto características epiteliais quanto mesenquimais. Isso indica o processo de transição epitelial-mesenquimal parcial, caracterizado por um perfil híbrido na expressão das caderinas por essas células, apresentando um maior risco de sofrer metastase quando comparado as células que sofrem TEM completa (Grosse-Wilde *et al.*, 2015).

Diante de escassas informações sobre o papel da TEM na progressão de melanomas, principalmente em cães, torna-se evidente a necessidade de avaliar o envolvimento da E-Caderina e N-Caderina na transição epitelial-mesenquimal e sua relação com a disseminação metastática e a um comportamento de pior prognóstico nesse tipo tumoral.

3. OBJETIVO

Identificar e correlacionar a expressão das proteínas envolvidas na TEM, E-caderina e N-caderina, em melanomas caninos e seus respectivos linfonodos metastáticos, além de investigar a relação da expressão dessas proteínas com o tempo de sobrevivência dos animais acometidos com melanomas.

3.1. Objetivos Específicos

- Classificar as lesões primárias e linfonodos regionais de acordo com os critérios histopatológicos empregados em diagnósticos de melanomas caninos orais e cutâneos;
- Realizar a confirmação diagnóstica de melanoma canino metastático, mediante a avaliação da expressão do marcador Melan-A e PNL-2;
- Identificar a expressão imuno-histoquímica de E-Caderina e N-Caderina em melanomas caninos primários e em metástases linfáticas regionais;
- Correlacionar as características histopatológicas com a expressão imuno-histoquímica de E-Caderina e N-Caderina e com o tempo de sobrevivência dos animais acometidos com melanoma;
- Correlacionar a expressão de E-Caderina e N-Caderina em melanomas primários metastáticos e não metastáticos, com o tempo de sobrevivência dos animais acometidos com melanoma.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 228/2023).

4.2. Espécimes

Foram analisados 32 casos de melanomas caninos e seus respectivos linfonodos regionais, obtidas a partir dos arquivos do Laboratório do Comportamento Celular

(LCC) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e de lesões obtidas de cães submetidas à exérese cirúrgica de diferentes clínicas de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo que foram encaminhadas ao LCC para diagnóstico histopatológico entre os anos de 2015 e 2023.

4.3. Avaliação Histopatológica

Amostras histológicas de melanomas caninos, fixadas em formol neutro e tamponado a 10%, incluídas em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina foram analisados em microscopia óptica para caracterização histopatológica.

Foi determinado o escore de pigmento das lesões (0: ausência de células neoplásicas pigmentadas; 2: células neoplásicas altamente pigmentadas), e avaliado a presença de êmbolo, atíпия, ulceração, desmoplasia, necrose (Smedley *et al.*, 2011).

4.4. Imuno-Histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (Novolink Polymer Detection Sistem). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado a 125°C (Pascal® Pressure Cooker) com Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ou EDTA pH 9,0. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 15 minutos em Protein Block Serum-Free Ready to Use (Novolink Polymer Detection Sistem). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação dos anticorpos primários de 16 horas e do cromógeno 3'3'-diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen system), de 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:20) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. (Silveira *et al.*, 2019).

Na Tabela I estão listadas as características do anticorpo e da reação. Para controle negativo foi omitida a etapa do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente

de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

Tabela I. Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imuno-histoquímico.

	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica
E-Caderina	Invitrogen	4A2C7	1:50	EDTA + Pascoal
N-Caderina	Dako	6G11	1:50	Citrato + Pascoal
Melan-A	Dako	A103	1:100	Citrato + Pascoal
Melanoma Antigen (PNL2)	Santa Cruz	PNL-2	1:100	Citrato + Pascoal

4.5. Interpretação da Imuno-Histoquímica

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 400 (Olympus – BX41). Os anticorpos anti-Melan-A e anti-Melanoma Antigen (PNL-2) foram utilizados para comprovar o diagnóstico de melanoma nas amostras estudadas. Realizou-se a imuno-histoquímica para Melan-A em todos os casos e para Melanoma Antigen em todos os casos amelanóticos e para aqueles melanóticos que não apresentaram marcação para Melan-A. Foram considerados positivos os casos que apresentaram marcação citoplasmática em mais de 10% das células neoplásicas, para qualquer um dos marcadores (Smedley *et al.*, 2011).

A marcação membranar e citoplasmática de N-Caderina além da marcação membranar de E-caderina foram avaliadas nas células neoplásicas e classificadas segundo o percentual de células neoplásicas marcadas: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%). Tumores com escore 3 ou 4 foram considerados com alta expressão para as proteínas estudadas (Veloso, *et al.*, 2020).

4.6. Análise de Sobrevida

Foram obtidos os dados de sobrevida dos animais somente após o tutor assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO I). Os dados dos pacientes foram coletados dos laudos histopatológicos, e informações do desfecho clínico foram obtidas diretamente com os clínicos veterinários responsáveis pela solicitação diagnóstica. O tempo de sobrevida foi definido (em meses) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal que morreu pela doença (end points). Os animais que vieram a óbito por razões desconhecidas ou causas não relacionadas ao tumor, ou que deixarem de ser acompanhados foram considerados censurados.

4.7. Análise Estatística

As associações e correlações foram avaliadas pelo teste de Qui-Quadrado e Spearman respectivamente. As curvas de sobrevida foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier. Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi <0.05 . As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Graph Pad Prism v. 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Aspectos histopatológicos dos melanomas caninos orais e cutâneos.

Dos 32 casos analisados, 47% (15/32) foram não metastáticos e 53% (17/32) metastáticos. Do total de casos, 59% (18/32) foram orais e 41% (14/32) cutâneos. As características histopatológicas das lesões estão apresentadas nas Tabelas II.

Tabela II. Características histopatológicas dos tumores primários usados no estudo.

n=32	Tumor Primário Metastático	Tumor Primário Não Metastático
	17 (100%)	15 (100%)
Tipo Histológico		
Epitelióide	9 (52,94%)	7 (46,67%)
Fusiforme	2 (11,76%)	2 (13,33%)

Misto	5 (29,41%)	6 (40%)
Balanoide	1 (5,88%)	0 (0%)
Escore Pigmento		
0	2 (12%)	2 (13,33%)
1	8 (47,06%)	5 (33,33%)
2	3 (17,65%)	7 (46,67%)
3	4 (23,53%)	1 (6,67%)
Necrose		
0	1 (5,88%)	4 (26,67%)
1	16 (94,12%)	11 (73,33%)
Êmbolo linfático		
0	5 (29,41%)	8 (53,33%)
1	12 (70,59%)	7 (46,67%)
Atipia >20%		
0	0 (0%)	0 (0%)
1	17 (100%)	15 (100%)
Úlcera		
0	0 (0%)	3 (20%)
1	17 (100%)	12 (80%)
Desmoplasia		
0	4 (23,53%)	3 (20%)
1	13 (76,47%)	12 (80%)
Oral	10 (58,82%)	8 (53,33%)
Cutâneo	7 (41,18%)	7 (46,67%)

Na análise de pigmentação, os tumores foram analisados separados entre aqueles abaixo de 50% de pigmentação (escore 0, 1 e 2) e acima de 50% de pigmentação (escore 3 e 4), seguindo a recomendação de Smedley e colaboradores (2011). Melanomas metastáticos apresentam predominantemente pigmentação abaixo de 50%. Quando analisado separadamente, melanomas cutâneos ou orais, não foi observado uma diferença entre a frequência de pigmentação entre melanomas metastáticos e não metastáticos. (Figura 2)

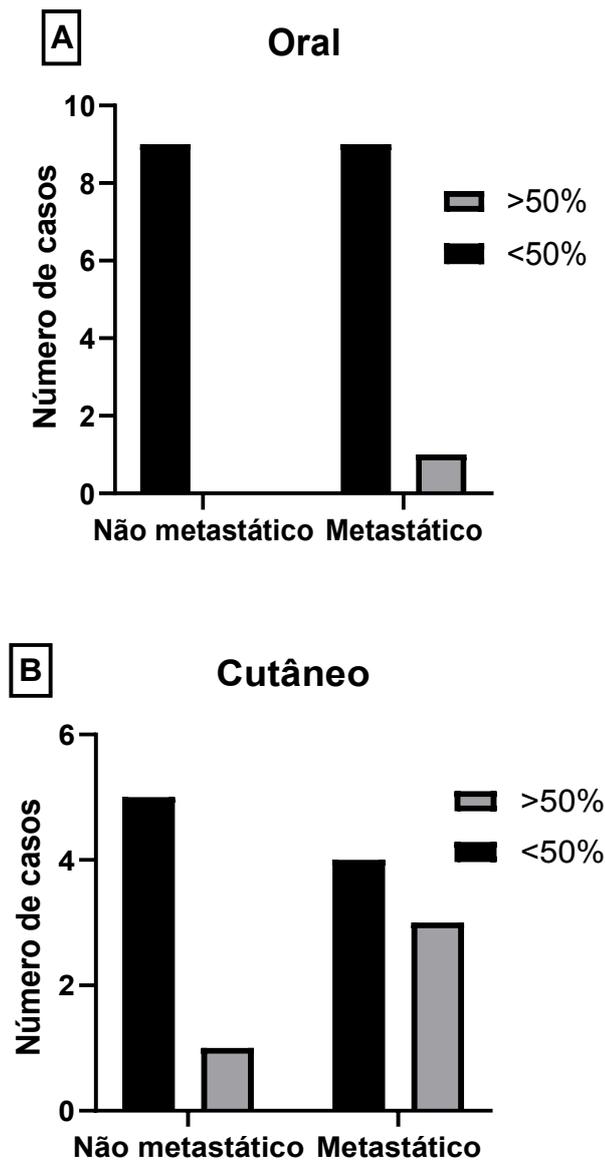


Figura 2. Apresentação da frequência pigmentação em melanomas orais e cutâneos, metastáticos e não metastáticos. Os tumores foram classificados em <50% de pigmentação (escores 0, 1, 2) e >50% de pigmentação (escores 3, 4).

Ao analisar o tipo histológico predominante nos tumores não metastáticos e metastáticos conforme sua localização, observou-se que, nos melanomas orais, predominou o tipo epitelióide em ambos os grupos (Não metastáticos 5/15 (33,3%); Metastáticos 6/17 (35,29%)). Nos melanomas cutâneos, os tumores não metastáticos apresentaram um predomínio do tipo misto, enquanto os tumores metastáticos mostraram um predomínio do tipo epitelióide. (Figura 3)

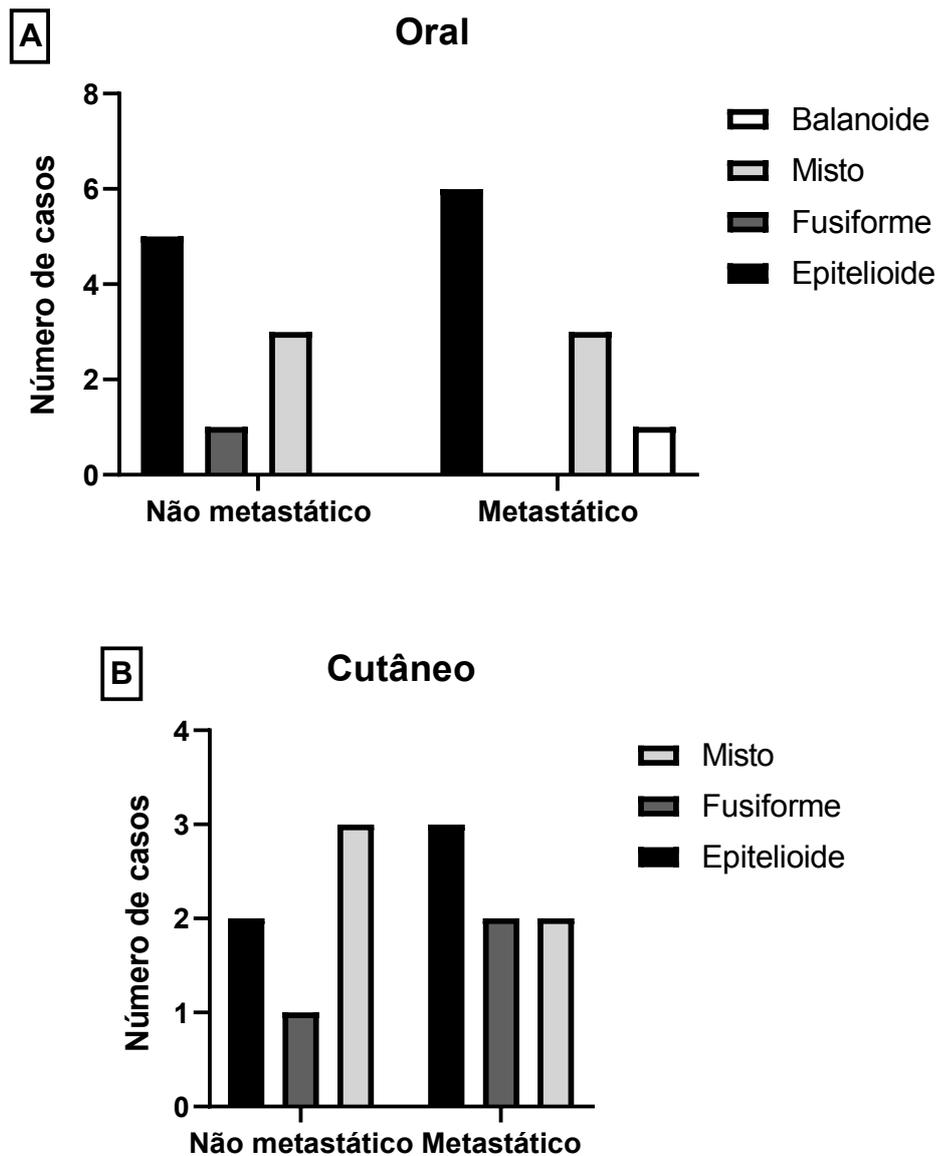


Figura 3. Tipo histológico predominante em melanomas orais e cutâneos, metastáticos e não metastáticos. A) Nos melanomas orais, o tipo epiteloide predominou tanto nos tumores metastáticos quanto nos não metastáticos. B) Nos melanomas cutâneos, os tumores não metastáticos apresentaram um predomínio do tipo misto, enquanto os tumores metastáticos mostraram um predomínio do tipo epiteloide.

Na análise de presença de êmbolos neoplásicos, foi observada uma maior frequência de êmbolos em tumores metastáticos. Essa frequência pode ser observada também quando analisado separadamente tumores orais ou cutâneos (Figura 4).

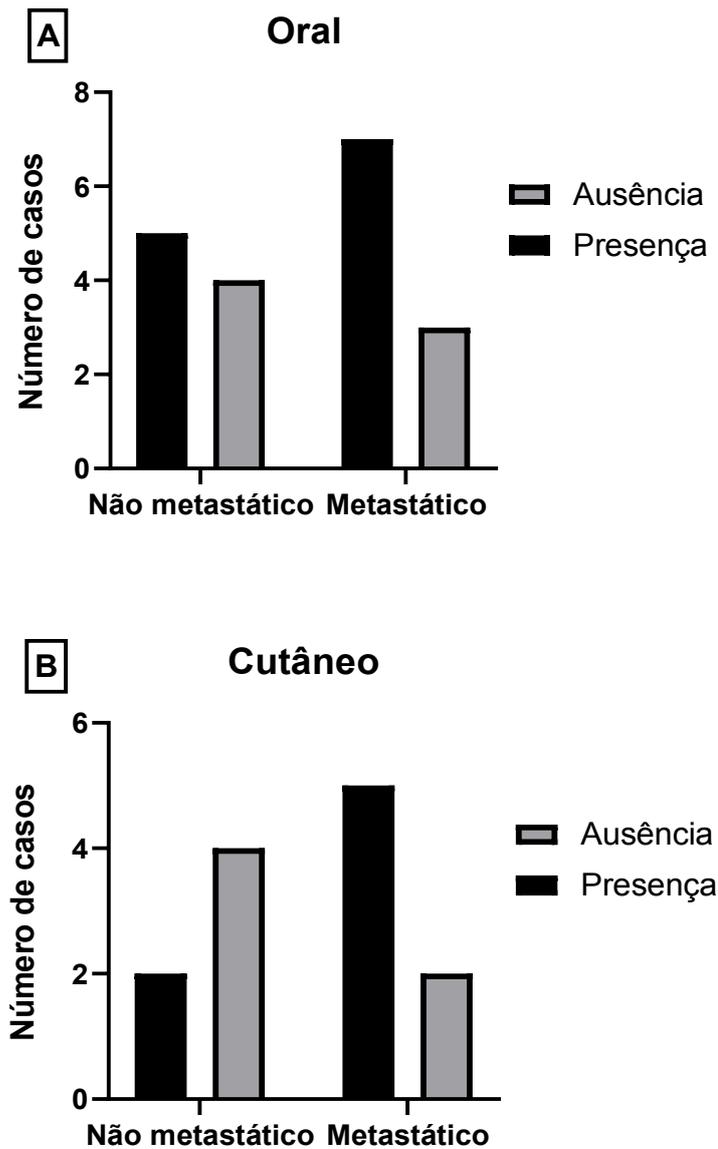


Figura 4. Apresentação da frequência de êmbolos nos tumores metastáticos e não metastáticos, conforme a localização. A) Análise da presença ou ausência de êmbolo nos tumores primários orais. B) Análise da presença ou ausência de êmbolo nos tumores primários cutâneos.

Em relação a presença de úlceras, independentemente da localização, tumores metastáticos apresentam maior frequência de úlceras. Quando analisado separadamente tumores orais ou cutâneos, essa frequência permaneceu, onde 10 casos (52.63%) dos melanomas orais metastáticos e 7 casos (53.58%) dos melanomas cutâneos metastáticos apresentaram úlceras (Figura 5). Um aspecto semelhante foi observado na análise de necrose, onde a presença de necrose foi observada em 9 casos (47,37%) dos melanomas orais metastáticos. Nos melanomas cutâneos metastáticos, 6 casos (46,15%) apresentaram necrose (Figura 6).

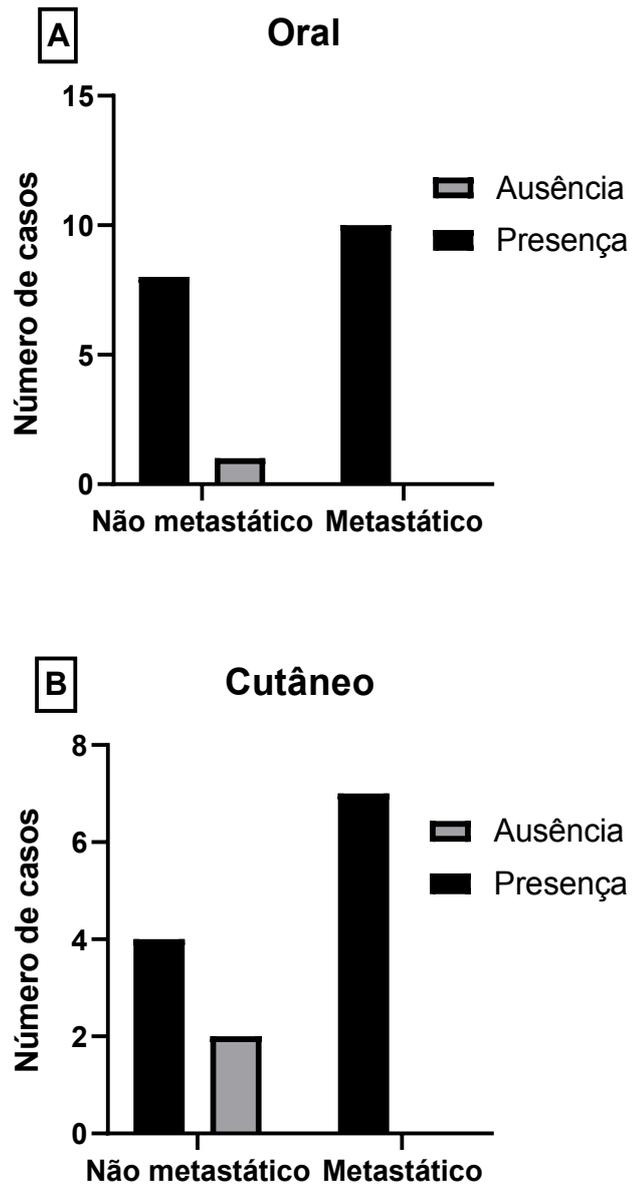


Figura 5. Apresentação da frequência de Ulceração em Melanomas Oraís e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos. A) Análise da presença de ulceração nos tumores primários orais. B) Análise da presença de ulceração em melanomas cutâneos não metastáticos e metastáticos.

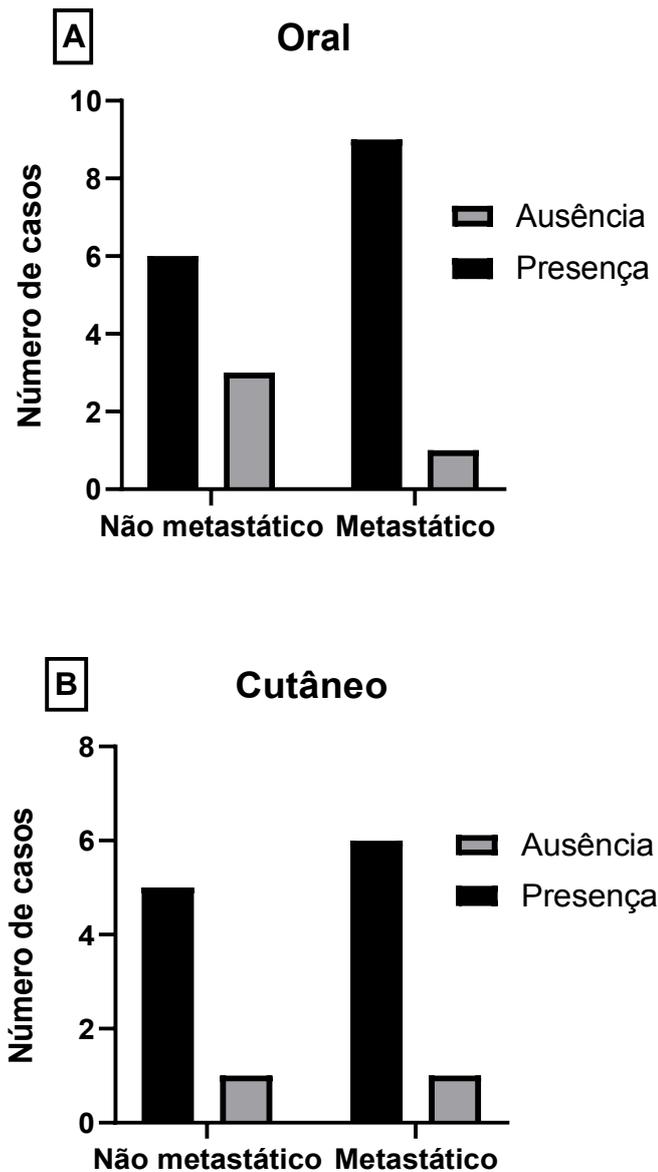


Figura 6. Apresentação da frequência de necrose em Melanomas Oraís e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos. A) Análise da presença de necrose nos tumores primários orais. B) Análise da presença de necrose em melanomas cutâneos não metastáticos e metastáticos.

A alta frequência de desmoplasia foi observada em melanomas caninos, tanto metastáticos quanto não metastáticos, independentemente de sua localização, sem diferenças significativas entre os tumores. (Figura 7).

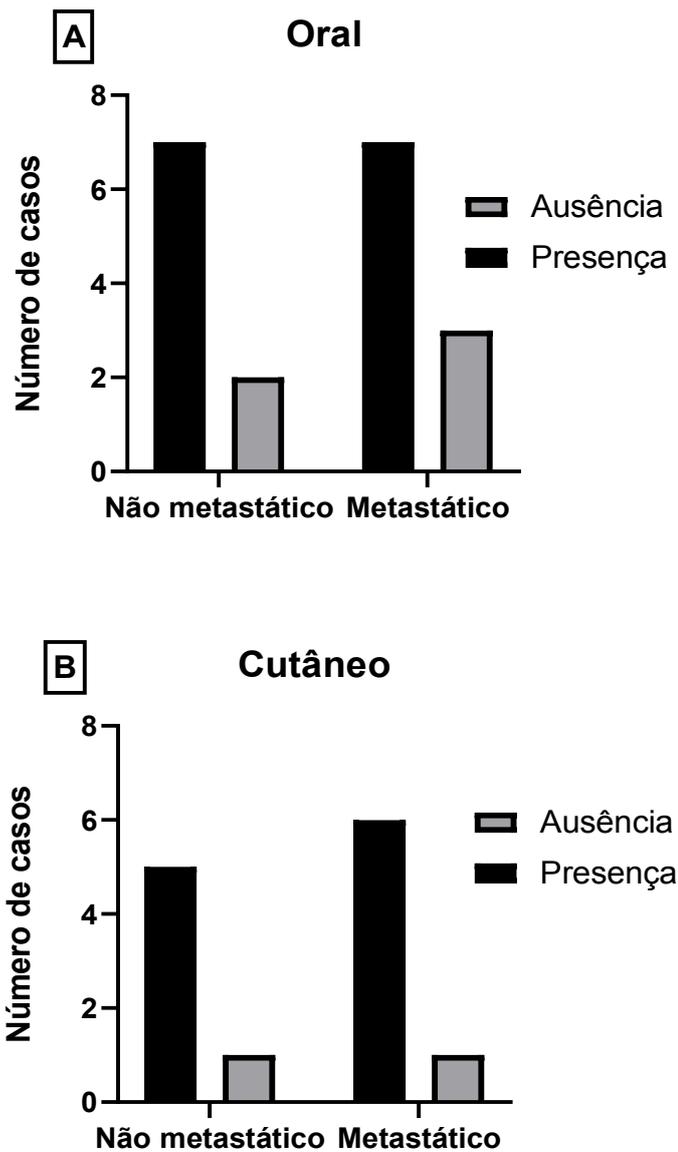


Figura 7. Apresentação da frequência de Desmoplasia em Melanomas Orais e Cutâneos Metastáticos e Não Metastáticos. A) Análise da presença de desmoplasia nos tumores primários orais. B) Análise da presença de desmoplasia em melanomas cutâneos não metastáticos e metastáticos.

5.2. Expressão de E-Caderina e N-caderina em melanomas metastáticos e não metastáticos.

Foi possível observar uma alta frequência de expressão das caderinas em tumores metastáticos e metástases linfonodais, sendo identificada expressão membranar de E-caderina e expressão citoplasmática e membranar de N-caderina (Figura 8).

Nas análises de correlação entre as alterações histopatológicas e a expressão de a expressão de E-Caderina, não foi observada nenhuma correlação significativa.

Melanomas metastáticos e não metastáticos apresentaram frequentemente uma alta expressão de E-caderina (escore 3 ou 4). Ou seja, a maioria dos tumores apresentaram acima de 50% das células neoplásicas positivas para expressão dessa proteína (Figura 9 e Figura 10).

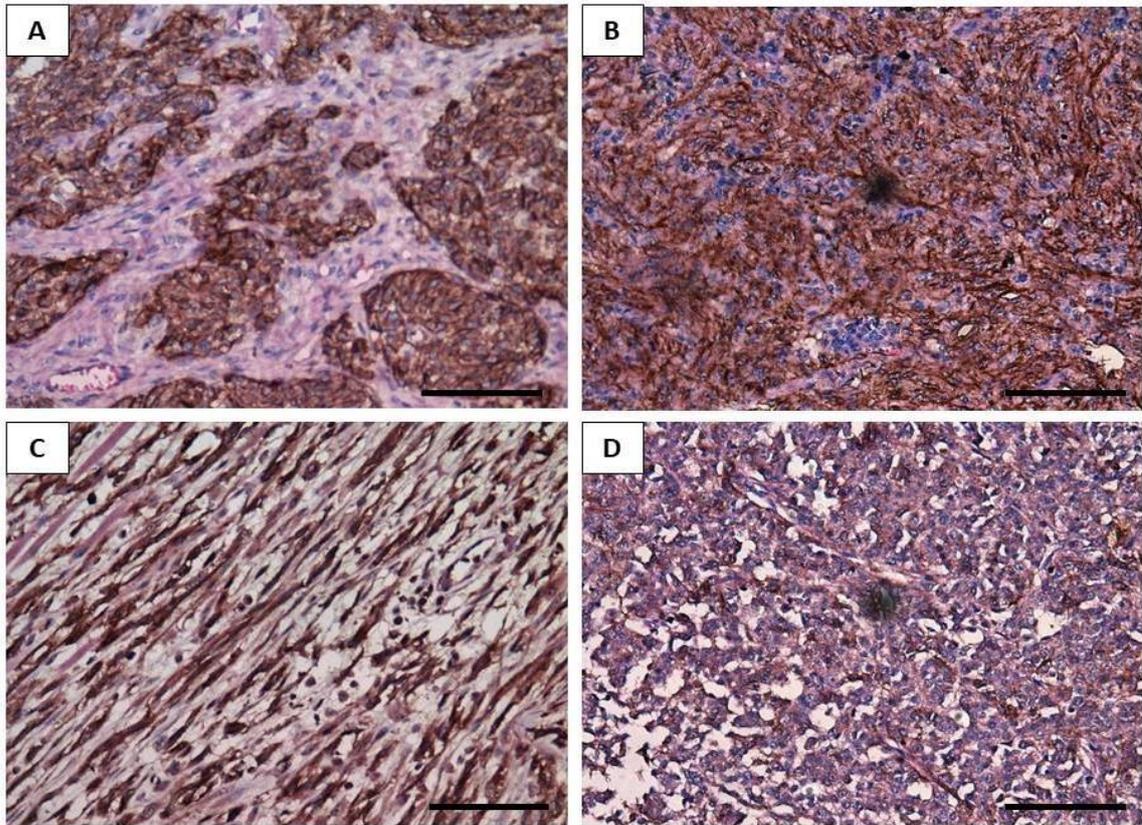


Figura 8. Imuno-histoquímica de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários e seus respectivos linfonodos regionais metastáticos no aumento de 40X (Escala 50 μ m). A) Forte marcação membranar de E-Caderina no tumor primário. B) Moderada marcação membranar de E-Caderina no linfonodo regional metastático. C) Forte marcação nuclear e citoplasmática de N-Caderina no tumor primário. D) Fraca marcação nuclear e citoplasmática de N-Caderina no linfonodo regional metastático.

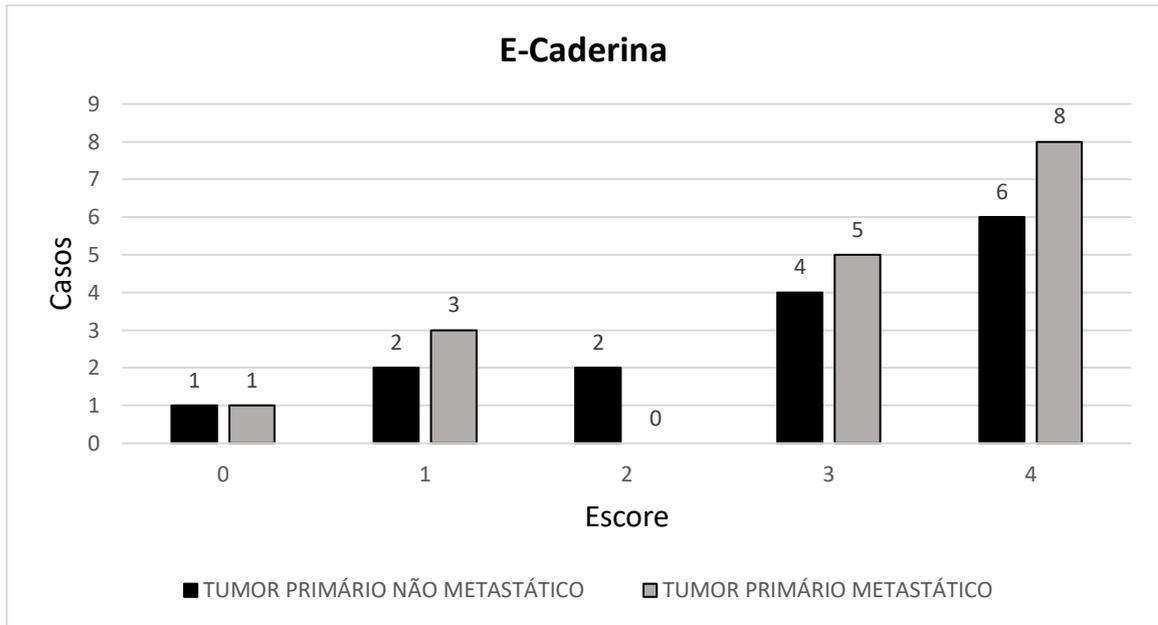


Figura 9. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%).

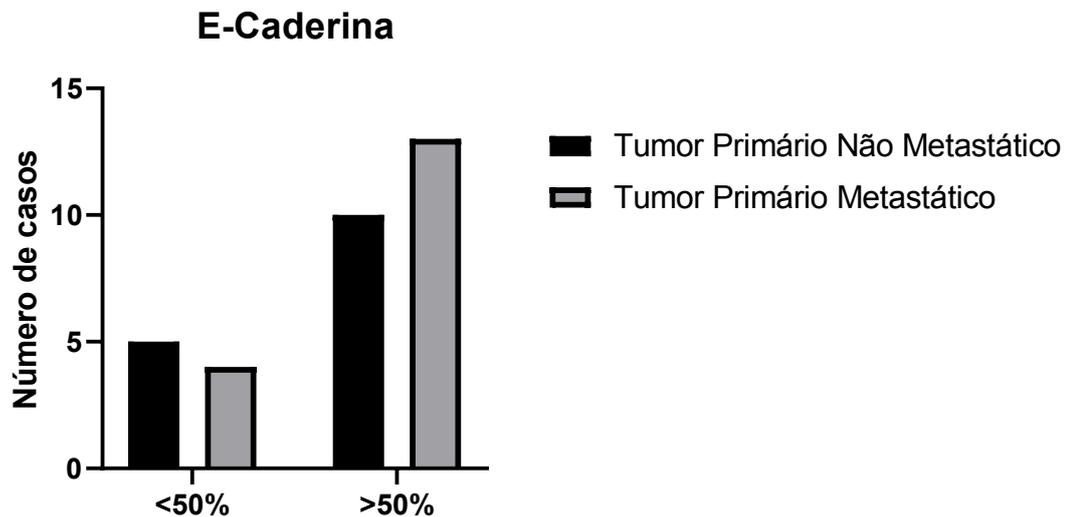


Figura 10. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: escore 0, 1 ou 2, foram reclassificados como baixa expressão (<50%), e os que apresentaram escore entre 3 ou 4 como alta expressão (>50%). ($p=0.6989$).

Dentre os tumores primários não metastáticos, foi observado uma maior frequência de tumores com baixa expressão de E-caderina (abaixo de 50% de expressão em células neoplásicas). De maneira contrária, os melanomas metastáticos apresentaram

alta expressão de N-caderina na maioria dos casos, com expressão acima de 50% das células neoplásicas (Figura 11).

De maneira interessante, tumores primários não metastáticos e metastáticos apresentaram diferença significativa em sua frequência de expressão acima de 50% das células para N-Caderina, 6 casos (18.75%) para os não metastáticos e 14 casos (43.75%) os metastáticos, respectivamente ($p= 0.0269$) (Figura 12).

Em relação aos aspectos histopatológicos, a expressão de N-Caderina não apresentou correlação com nenhum dos dados analisados.

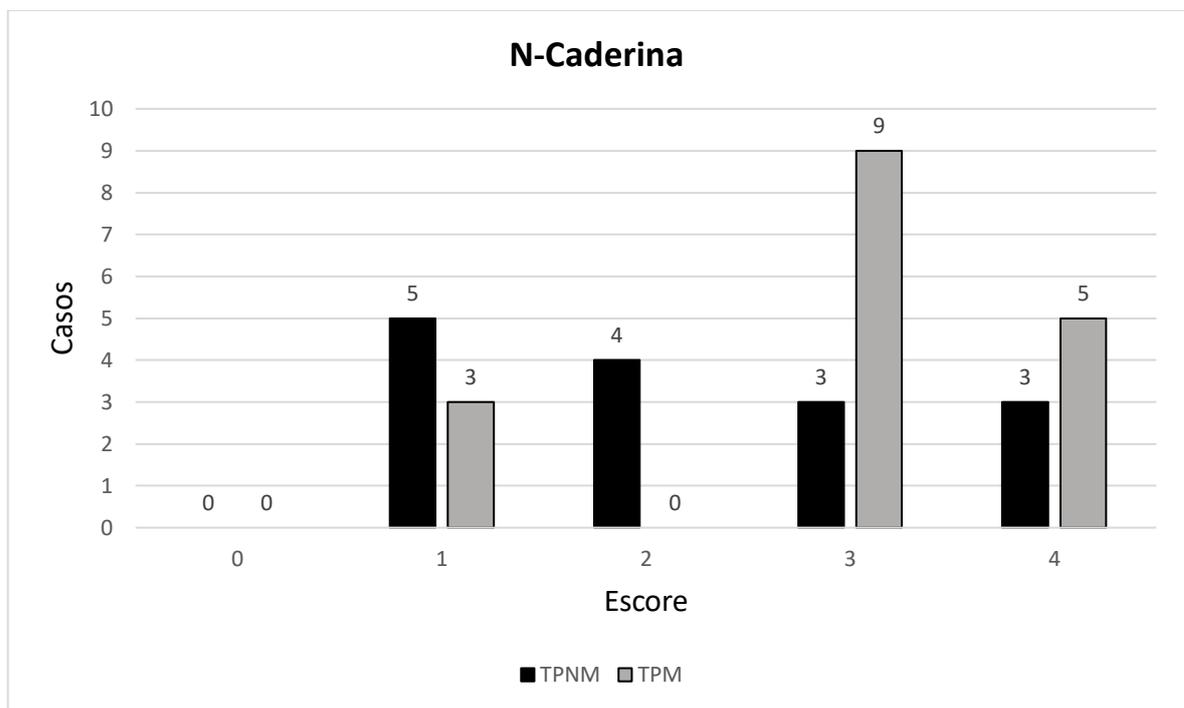


Figura 11. Frequência de expressão de N-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%).

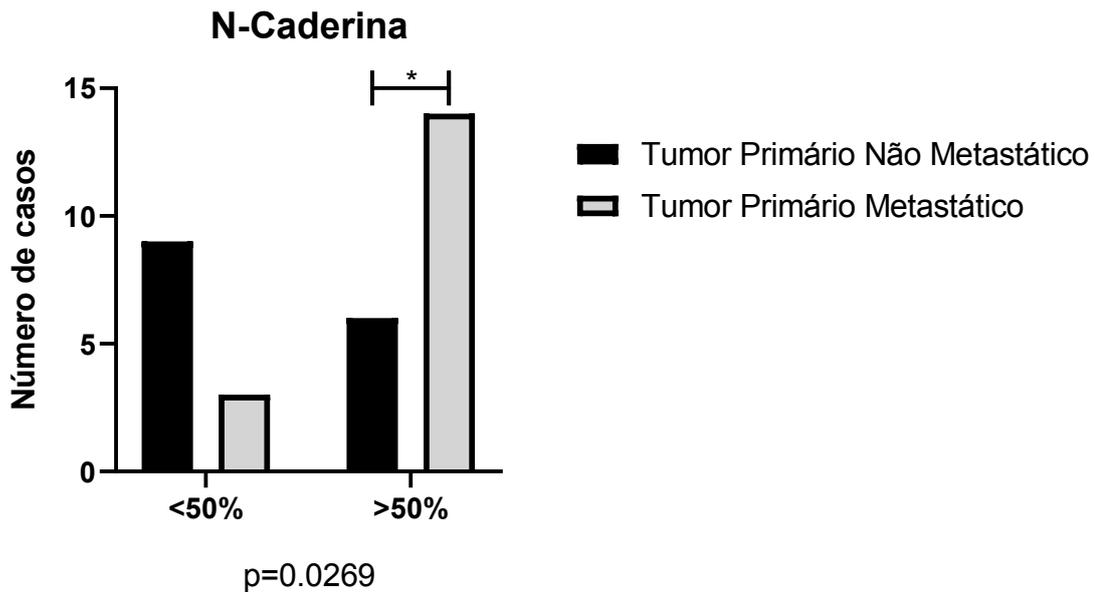


Figura 12. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: escore 0, 1 ou 2, foram reclassificados como baixa expressão (<50%), e os que apresentaram escore entre 3 ou 4 como alta expressão (>50%). (p= 0.0269).

5.3. Correlação entre as expressões de E-Caderina e N-Caderina em melanomas caninos e seus linfonodos metastáticos.

Quando analisado os tumores primários metastáticos, foi observada uma correlação positiva entre a expressão de E-Caderina e N-Caderina ($r= 0.539$, $p= 0.025$). Tal correlação não é observada quando analisada a expressão dessas mesmas proteínas nas metástases linfonodais ($r= 0.247$, $p= 0.339$) ou em tumores não metastáticos ($r= 0.037$, $p= 0.895$).

Quando os tumores não metastáticos foram analisados de acordo com a localização do tumor primário, foi observada uma correlação positiva significativa entre as expressões de E-Caderina e N-Caderina em tumores primários não metastáticos orais ($r= 0.684$, $p= 0.042$). Em tumores orais metastáticos não foi observada esse tipo de correlação.

De maneira inversa, em melanomas cutâneos não metastáticos, é observada uma correlação negativa entre esses marcadores, ($r= -0.926$, $p= 0.008$) demonstrando que, a menor expressão de E-Caderina está relacionado a uma maior expressão de N-Caderina nesses tumores. Em melanomas cutâneos metastáticos essa correlação se

inverte, sendo observada uma correlação forte e estatisticamente significativa entre a expressão de E-Caderina e N-Caderina ($r= 0.776$, $p= 0.040$).

5.4. Relação dos aspectos histopatológicos com a expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários não metastáticos

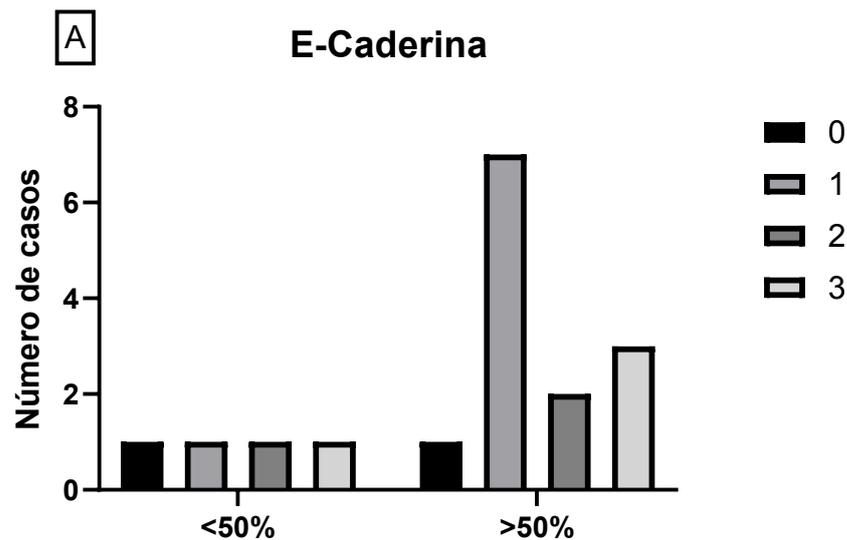
A Tabela III apresenta a análise dos achados histopatológicos em função dos níveis de expressão de E-caderina e N-caderina, categorizados em <50% e >50%, nos tumores primários não metastáticos.

Tabela III. Características histopatológicas dos casos não metastáticos usados no estudo.

n=15	E-Caderina <50%	E-Caderina >50%	N-Caderina <50%	N-Caderina >50%
Tipo Histologico				
Epitelioide	13%	33%	40%	7%
Fusiforme	13%	0%	7%	7%
Misto	8%	33%	13%	26%
Balanoide	0%	0%	0%	0%
Escore Pigmento				
0	7%	7%	7%	7%
1	26%	7%	20%	13%
2	0%	46%	26%	20%
3	0%	7%	7%	0%
Necrose				
0	13%	13%	7%	20%
1	20%	55%	53%	20%
Êmbolo linfático				
0	20%	27%	20%	27%
1	13%	40%	40%	13%
Atipia >20%				
0	0%	0%	0%	0%
1	32%	68%	60%	40%

Úlcera				
0	13%	7%	13%	7%
1	20%	60%	47%	33%
Desmoplasia				
0	0%	20%	40%	13%
1	33%	47%	20%	27%

Na análise de pigmentação, os tumores foram classificados de acordo com os escores 0, 1, 2 e 3, e também foram avaliados quanto à expressão de E-Caderina e N-Caderina, sendo categorizados em <50% e >50% das células neoplásicas marcadas. Observou-se um predomínio do escore 1, com 7 casos, nos tumores com >50% das células neoplásicas marcadas para E-Caderina. Por outro lado, em tumores que expressaram <50% de N-Caderina, houve um predomínio do escore 2, com 4 casos (Figura 13).



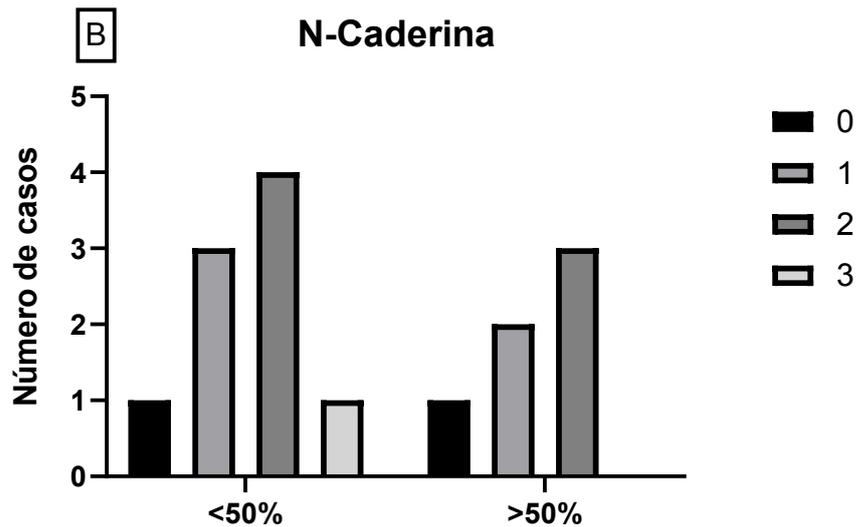


Figura 13. Análise da pigmentação e expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores. Os tumores foram classificados em escores de pigmentação 0, 1, 2 e 3. Adicionalmente, a expressão de E-Caderina e N-Caderina foi categorizada como <50% e >50% das células neoplásicas marcadas. A) Escore de Pigmentação de E-Caderina. B) Escore de pigmentação de N-Caderina.

Ao analisar o tipo histológico predominante nos tumores de acordo com a expressão de E-Caderina e N-Caderina (<50% e >50% das células neoplásicas marcadas), observou-se que, em tumores com mais de 50% de expressão de E-Caderina, houve uma frequência similar dos tipos epitelióide e fusiforme (Figura 14).

Em contrapartida, em tumores com menos de 50% de marcação para N-Caderina, o tipo epitelióide foi predominante, essa baixa expressão de N-Caderina pode indicar uma menor propensão das células tumorais a adquirir características mesenquimais, mantendo-se predominantemente epiteliais. Já nas células com mais de 50% de expressão de N-Caderina, o tipo fusiforme predominou. Este tipo celular é característico de uma morfologia mais alongada e frequentemente associada a um comportamento mais invasivo e migratório, típicos de células que passaram pela transição epitélio-mesenquimal. A alta expressão de N-Caderina nestes tumores sugere uma maior plasticidade celular e potencial agressivo.

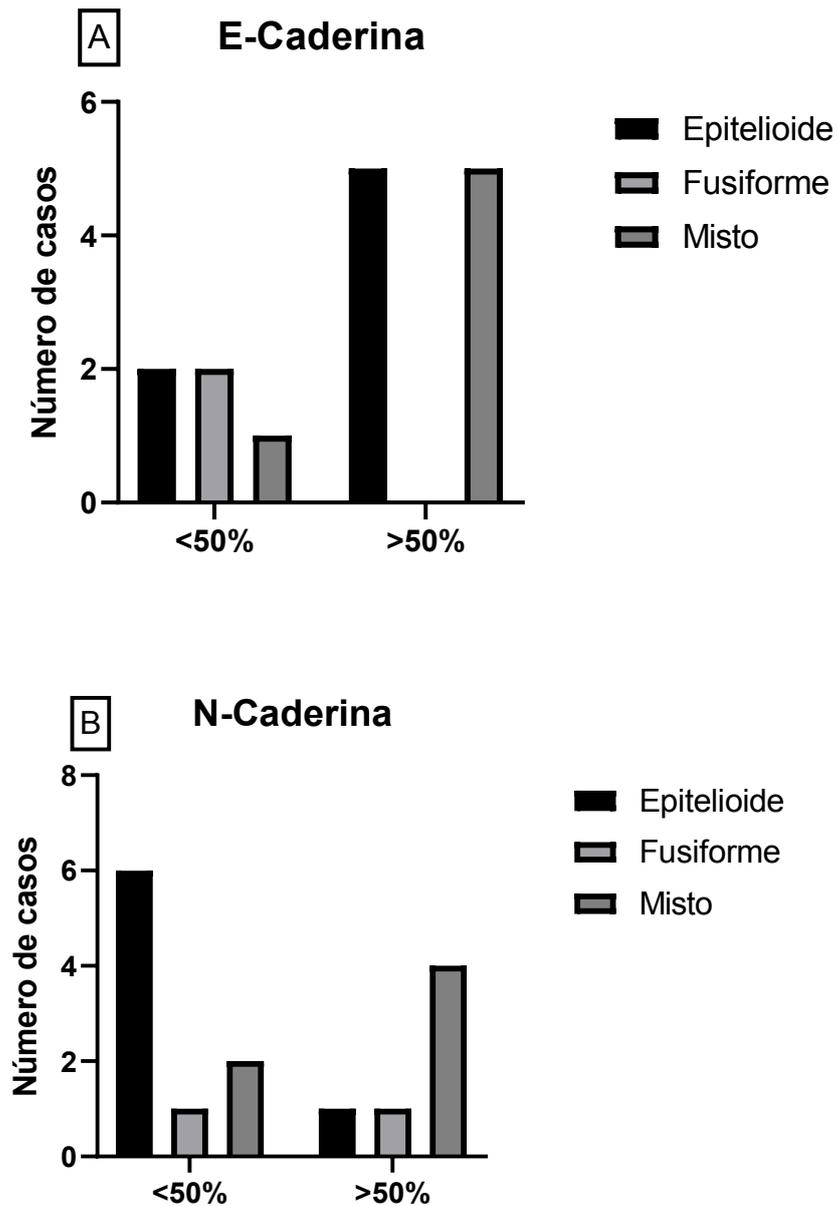


Figura 14. Análise do tipo histológico predominante nos tumores de acordo com a expressão de E-Caderina e N-Caderina. Os tumores foram classificados com base na porcentagem de células neoplásicas marcadas (<50% e >50%). A) Análise do tipo tumoral em tumores expressando E-Caderina. B) Análise do tipo tumoral em tumores expressando N-Caderina.

Na análise da presença de êmbolos neoplásicos, observou-se uma maior frequência de êmbolos em tumores com mais de 50% de expressão de E-Caderina, mesmo que sem diferença estatística ($p=0.6084$). Em contrapartida, nos tumores com menos de 50% de expressão de N-Caderina, também foi notada, mesmo que sem significância estatística ($p=0.3147$), uma maior frequência de êmbolos. (Figura 15).

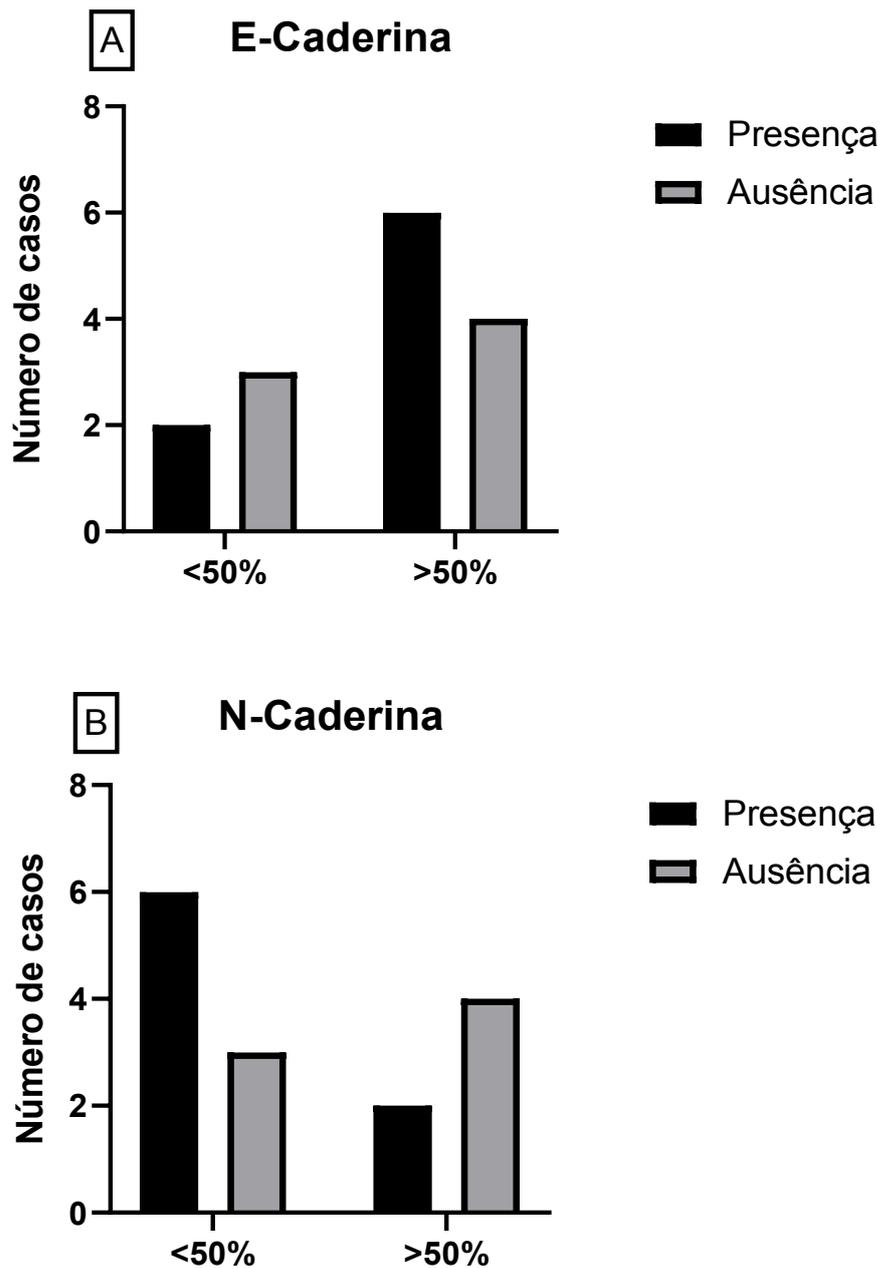


Figura 15. Análise da presença de êmbolos neoplásicos em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina. A) Análise da presença de ulcera em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de ulcera em tumores que expressam N-Caderina.

Em relação à presença de úlceras, foi observado um predomínio em tumores com mais de 50% de expressão de E-Caderina. Já Na análise da presença de úlceras em relação ao marcador N-Caderina, observou-se um predomínio da presença de úlceras em ambas as expressões de N-Caderina (Figura 16).

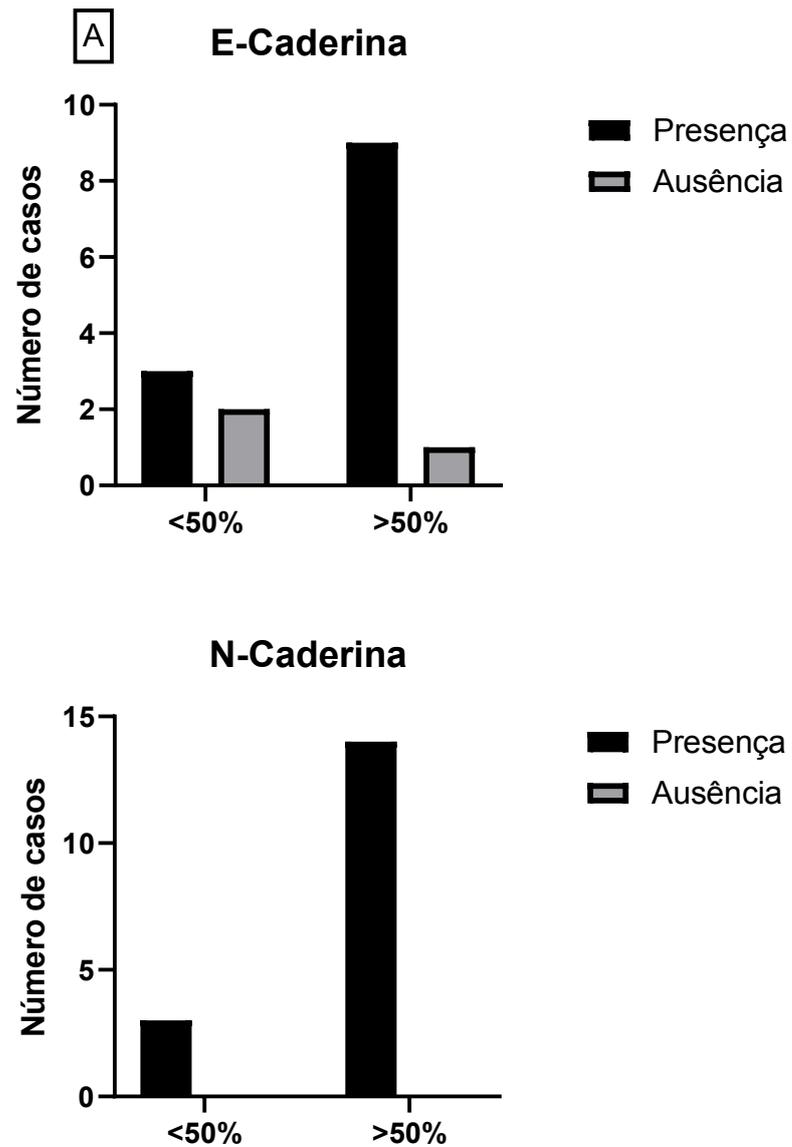


Figura 16. Análise da presença de úlceras em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise da presença de ulceração em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de ulceração em tumores que expressam N-Caderina.

Na análise da presença de necrose, observou-se um predomínio significativo de necrose nas células neoplásicas com mais de 50% de expressão de E-Caderina. Por outro lado, em células neoplásicas que expressam N-Caderina, foi observado um predomínio de necrose nas células com menos de 50% de expressão (Figura 17).

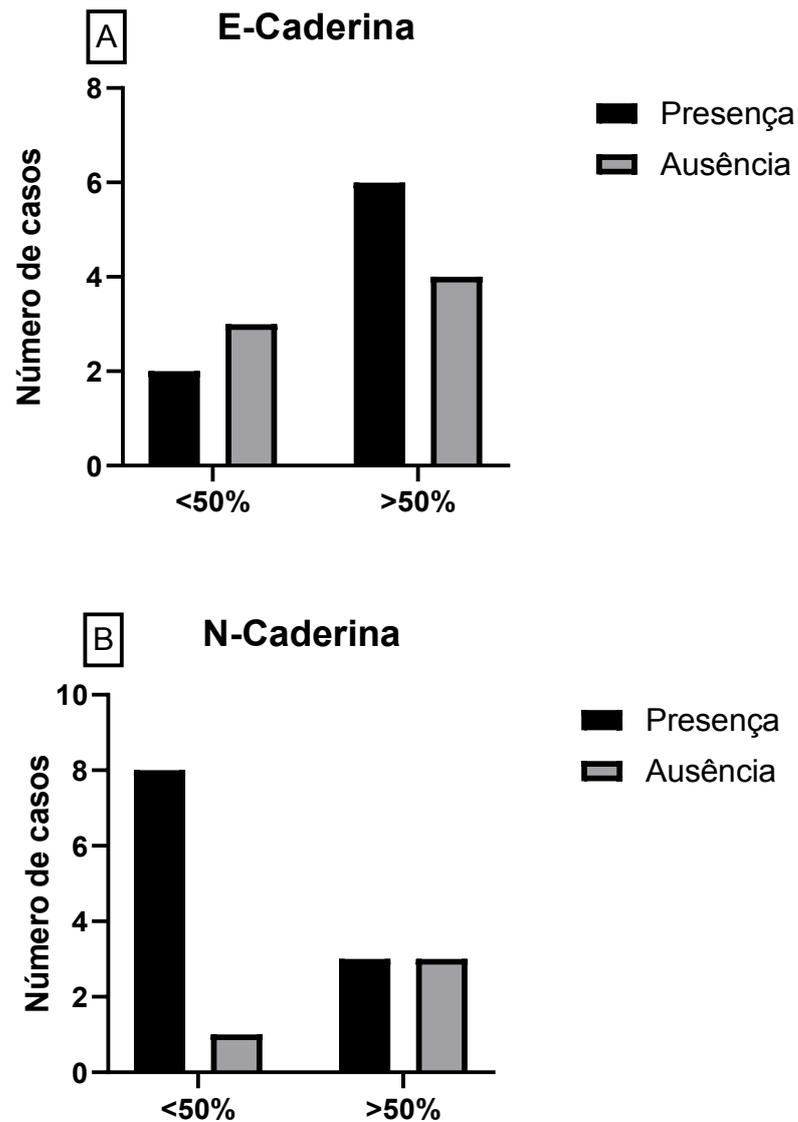


Figura 17. Análise da presença de necrose em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em células neoplásicas. A) Análise da presença de necrose em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de necrose em tumores que expressam N-Caderina.

Foi observado uma alta frequência de desmoplasia em tumores com mais de 50% de expressão de E-Caderina e N-caderina(Figura 18).

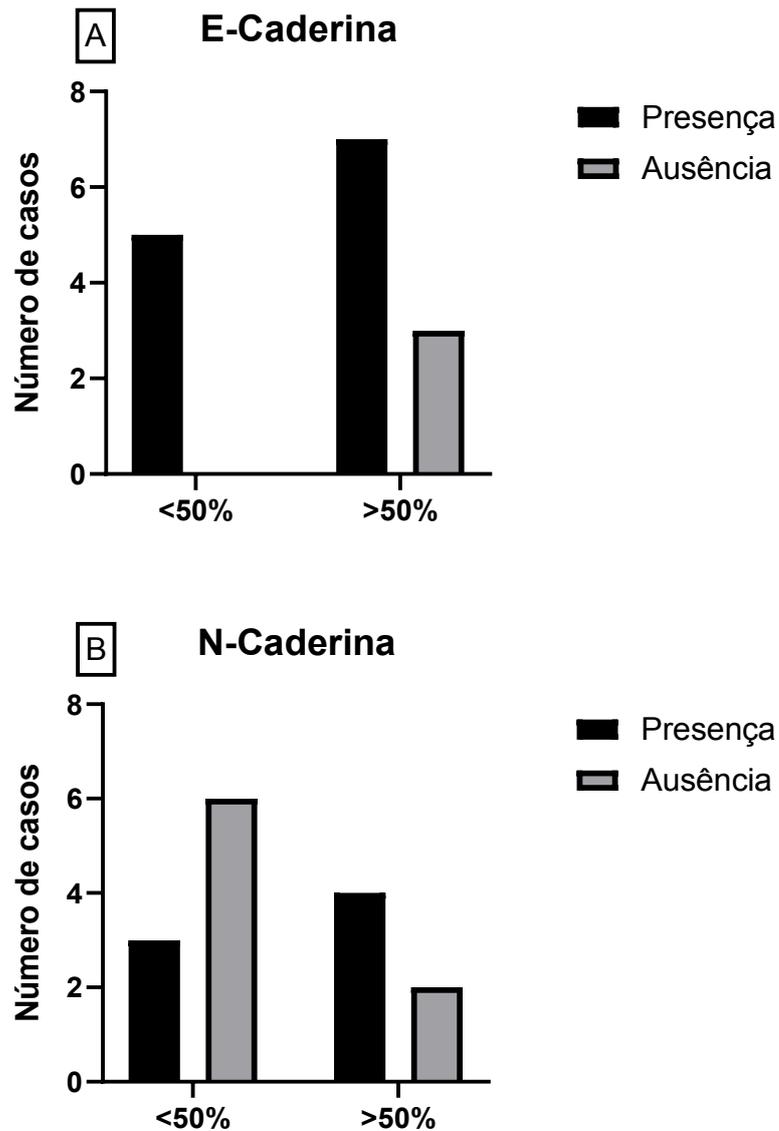


Figura 18. Análise da presença de desmoplasia em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em células neoplásicas. A) Análise da presença de desmoplasia em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da desmoplasia de necrose em tumores que expressam N-Caderina.

5.5. Relação dos aspectos histopatológicos com a expressão de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários metastáticos.

A Tabela IV apresenta a análise dos achados histopatológicos em função dos níveis de expressão de E-caderina e N-caderina, categorizados em <50% e >50%, nos tumores primários metastáticos.

Tabela IV. Características histopatológicas dos casos metastáticos usados no estudo.

n=17	E-Caderina <50%	E-Caderina >50%	N-Caderina <50%	N-Caderina >50%
Tipo Histológico				
Epitelióide	6%	47%	6%	47%
Fusiforme	6%	6%	0%	12%
Misto	6%	23%	6%	23%
Balanoide	0%	6%	6%	0%
Escore Pigmento				
0	6%	6%	0%	11,76%
1	6%	41,18%	6%	41,18%
2	6%	11,77%	6%	11,76%
3	6%	17,65%	6%	17,65%
Necrose				
0	6%	6%	6%	0%
1	0%	70%	12	82%
Êmbolo linfático				
0	24%	23%	6%	23,00%
1	6%	47%	12%	59%
Atipia >20%				
0	0%	0%	0%	0%
1	50%	50%	50%	50%
Úlcera				
0	0%	0%	0%	0%
1	24%	76%	18%	82%
Desmoplasia				
0	6%	18%	12%	18%
1	18%	58%	6%	64%

Na análise de pigmentação dos tumores metastáticos, os mesmos foram classificados de acordo com os escores 0, 1, 2 e 3, e também foram avaliados quanto à expressão de E-Caderina e N-Caderina, sendo categorizados em <50% e >50% das células neoplásicas marcadas. Igual aos tumores não metastáticos, observou-se um predomínio do escore 1, 7 casos, nos tumores com >50% das células neoplásicas marcadas para E-Caderina. De maneira semelhante, tumores que expressaram >50% de N-Caderina, houve um predomínio do escore 1, 7 casos (Figura 19).

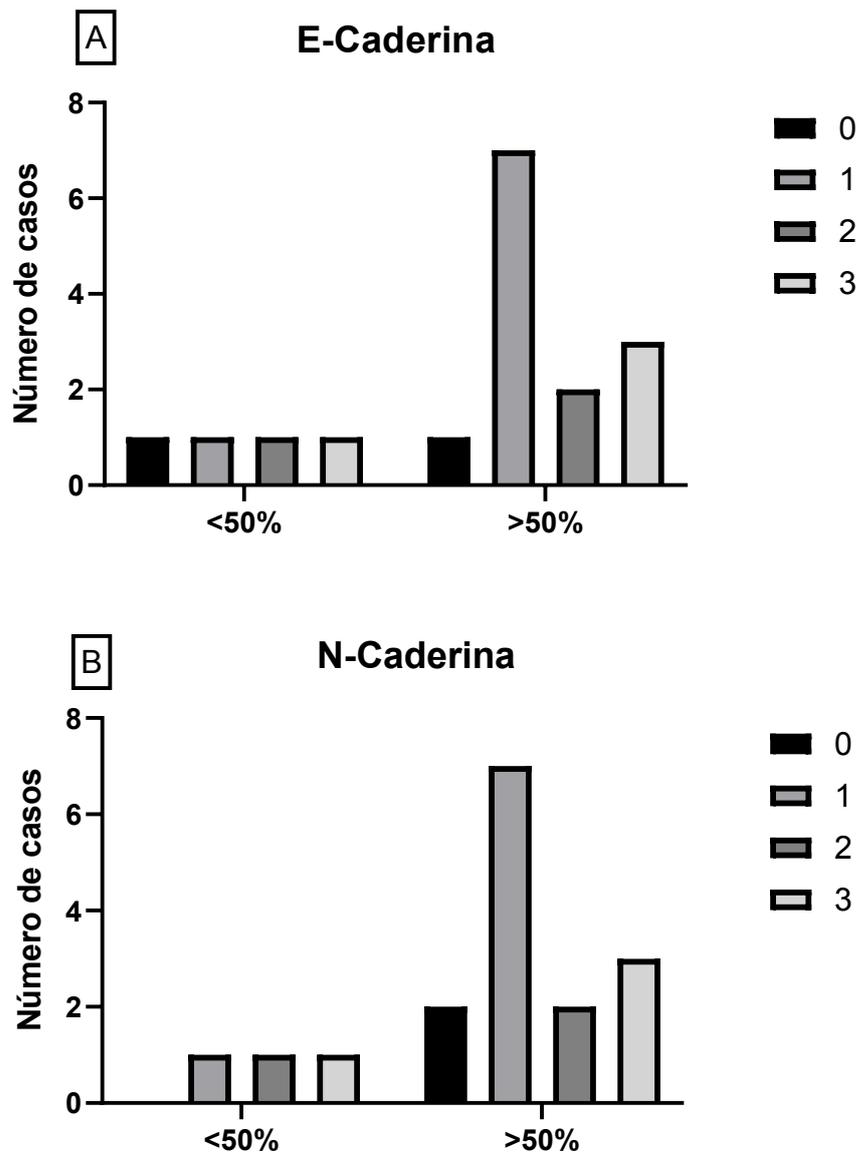


Figura 19. Análise da pigmentação em tumores metastáticos em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina. A) Análise de pigmentação em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise de pigmentação em tumores que expressam N-Caderina.

Na análise do tipo histológico predominante, foi observado que tanto em tumores com mais de 50% de marcação para E-Caderina quanto para N-Caderina, houve um predomínio significativo do tipo epitelióide (E-Caderina 8 casos; N-Caderina 8 casos) (Figura 20).

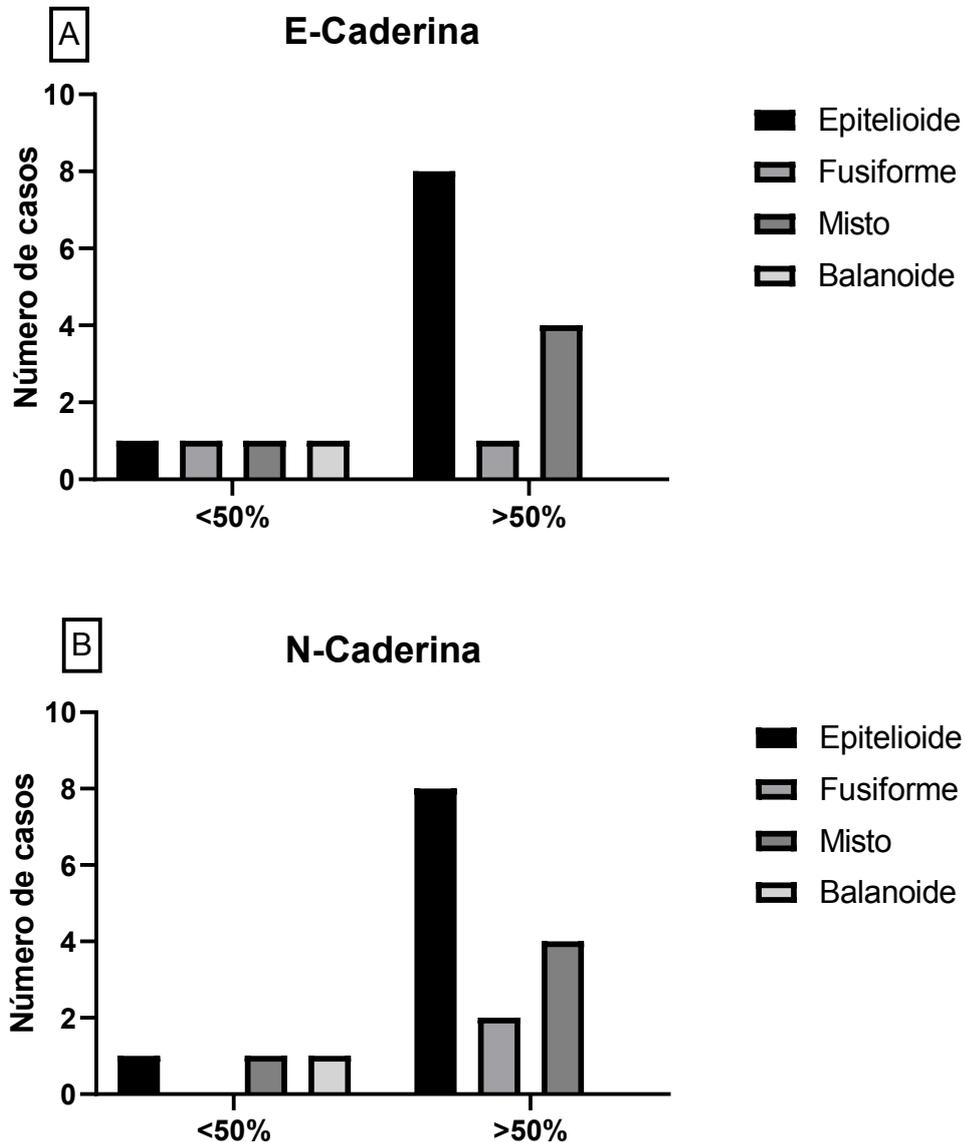


Figura 20. Análise do tipo histológico predominante em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise do tipo histológico em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise do tipo histológico em tumores que expressam N-Caderina.

Na análise da presença de êmbolos neoplásicos, foi observada uma maior frequência em tumores com mais de 50% de expressão para E-Caderina. Da mesma forma, também foi notada uma maior frequência de êmbolos em tumores com mais de 50% de expressão para N-Caderina (Figura 21).

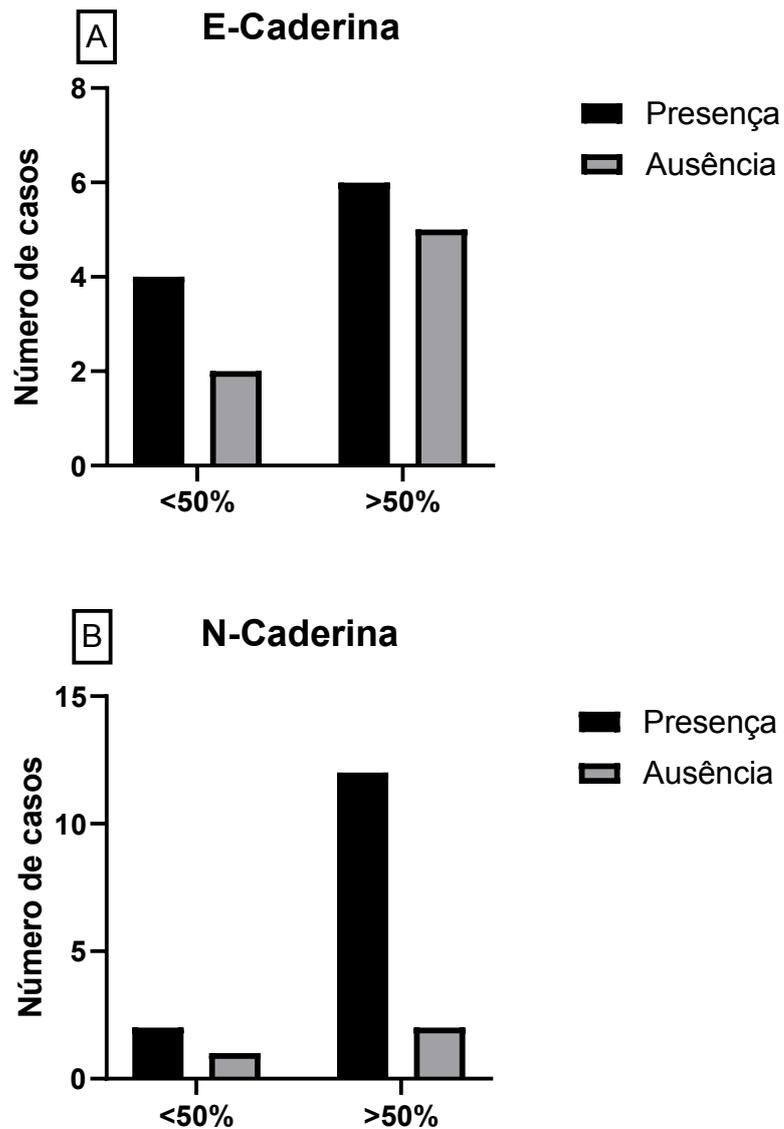


Figura 21. Análise da presença de êmbolo em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise da presença de êmbolo em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de êmbolo em tumores que expressam N-Caderina.

Ao analisar a presença de ulceração, observou-se que ambos os marcadores mostraram predominância significativa em tumores com mais de 50% de expressão para E-Caderina e N-Caderina (Figura 22).

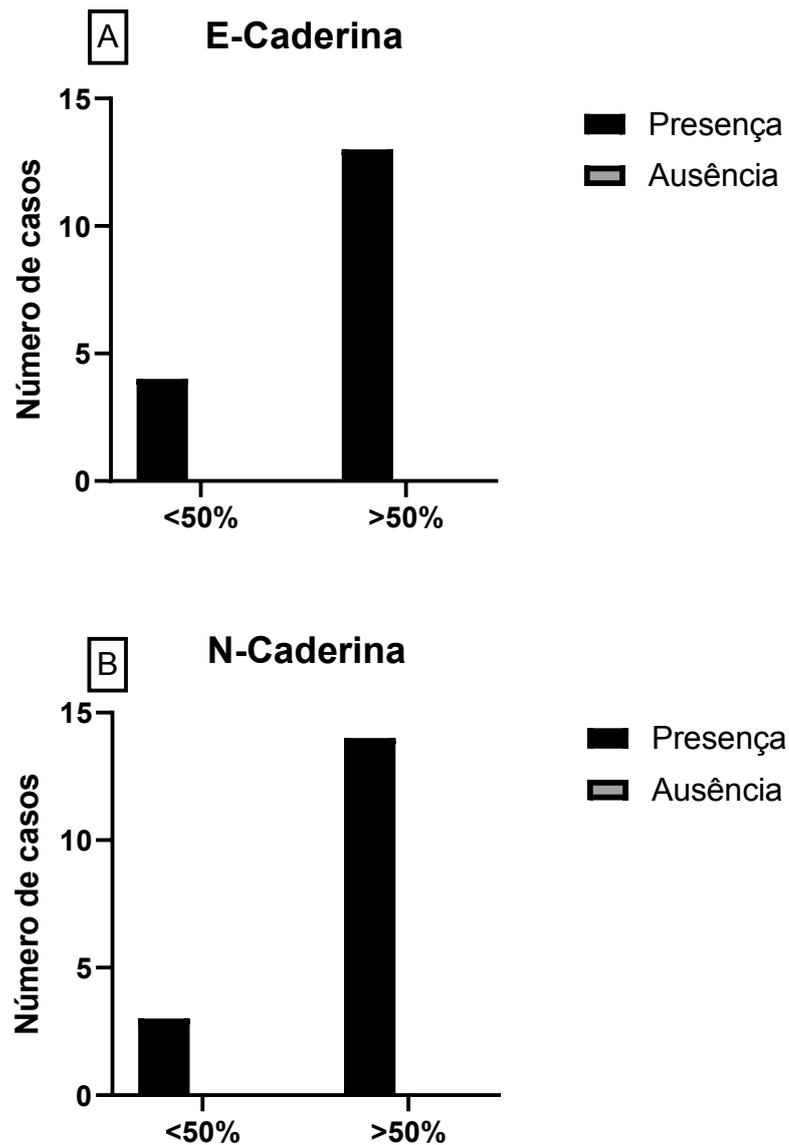


Figura 22. Análise da presença de ulcera em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise da presença de ulcera em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de ulcera em tumores que expressam N-Caderina.

Ao analisar a presença de necrose nas células neoplásicas, observou-se um predomínio significativo em tumores que expressam mais de 50% de E-Caderina e N-Caderina (Figura 23).

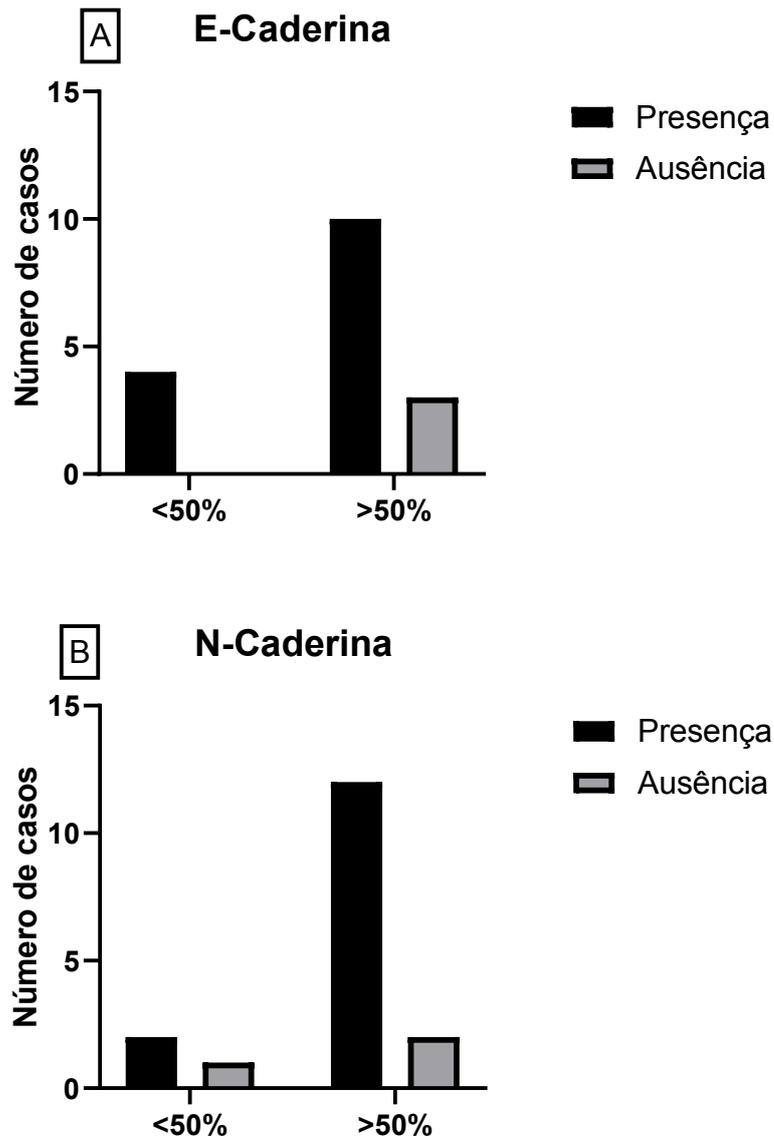


Figura 23. Análise da presença de necrose em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise da presença de necrose em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de necrose em tumores que expressam N-Caderina.

Foi observada uma alta frequência de desmoplasia em tumores que expressam mais de 50% de E-Caderina e N-Caderina (Figura 24).

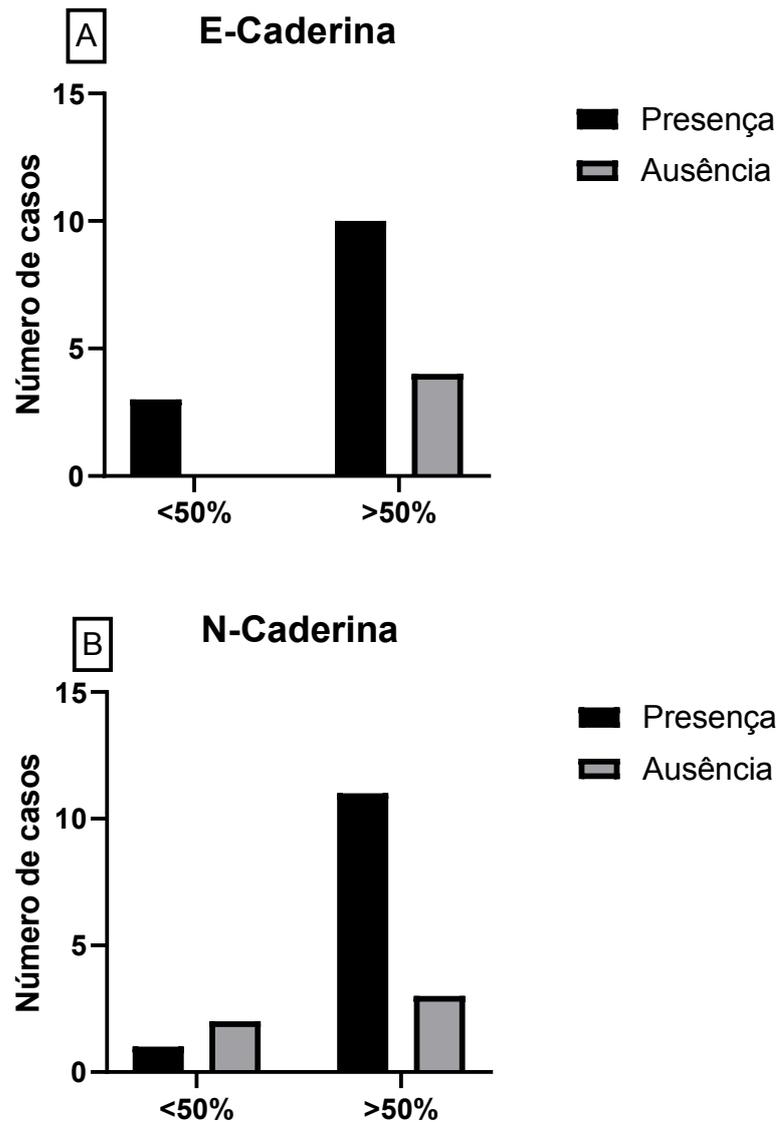


Figura 24. Análise da presença de desmoplasia em relação à expressão de E-Caderina e N-Caderina em tumores. A) Análise da presença de desmoplasia em tumores que expressam E-Caderina. B) Análise da presença de desmoplasia em tumores que expressam N-Caderina.

5.6. Sobrevida

Devido ao número reduzido de casos, não foi possível a análise da sobrevida, quando separado casos cutâneos ou orais. Assim, foram feitas análises de sobrevida independente da localização tumoral, considerando somente o potencial metastático dos tumores.

Os resultados indicaram que os animais com tumores primários não metastáticos, independente da localização tumoral, apresentaram um tempo de sobrevida significativamente maior. Os animais com melanomas metastáticos alcançaram uma

mediana de sobrevivência aos 3 meses, enquanto aqueles com melanomas não metastáticos atingiram a mediana aos 13 meses ($p=0.0141$) (Figura 25).

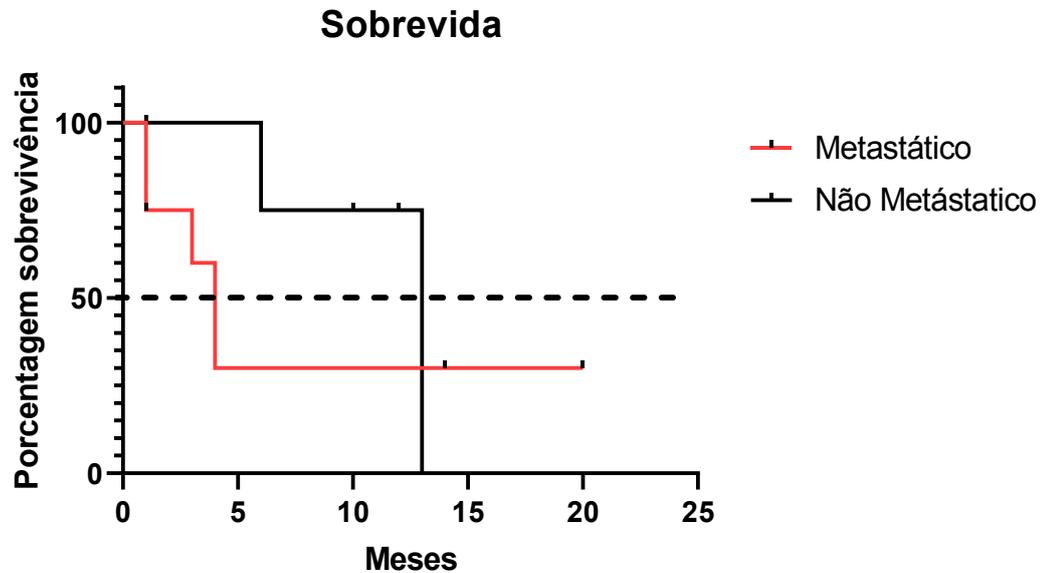


Figura 25. Comparação do tempo de sobrevivência em animais com melanomas metastáticos e não metastáticos.

Os resultados indicaram que animais com tumores que apresentaram o escore 1 para pigmento apresentaram tempo de sobrevivência menor, atingindo a mediana com 4 meses, do que aqueles que apresentaram pigmento com escore 2 e ausência de pigmentação, mas sem significância estatística ($p= 0.757$) (Figura 26).

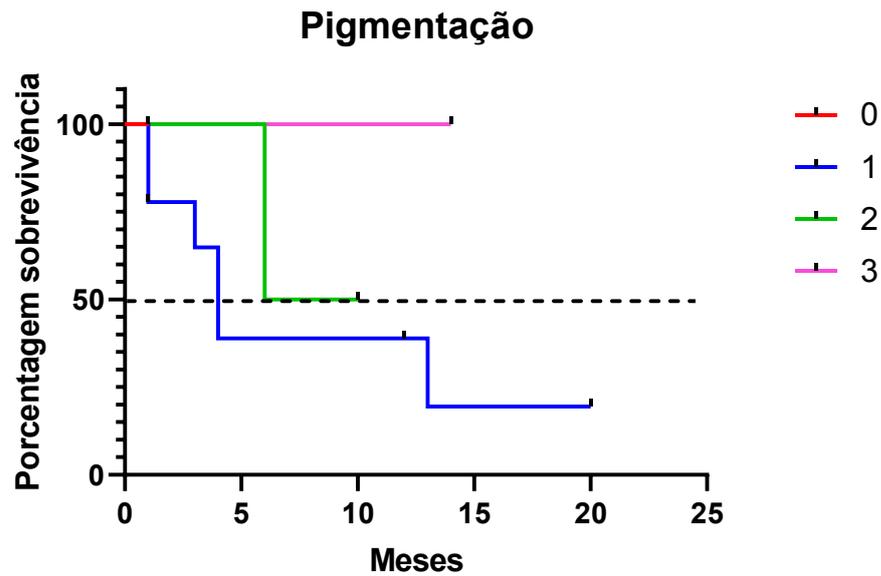


Figura 26. Comparação do tempo de sobrevivência em animais com tumores pigmentados e amelanóticos, categorizados pelos escores de pigmentação.

Em relação ao tipo histológico, observou-se que os animais com o tipo epitelióide ou misto apresentaram um tempo de sobrevivência menor, em relação aos animais com tumores no padrão fusiforme ou balanoide, contudo sem significância estatística ($p=0.065$) (Figura 27).

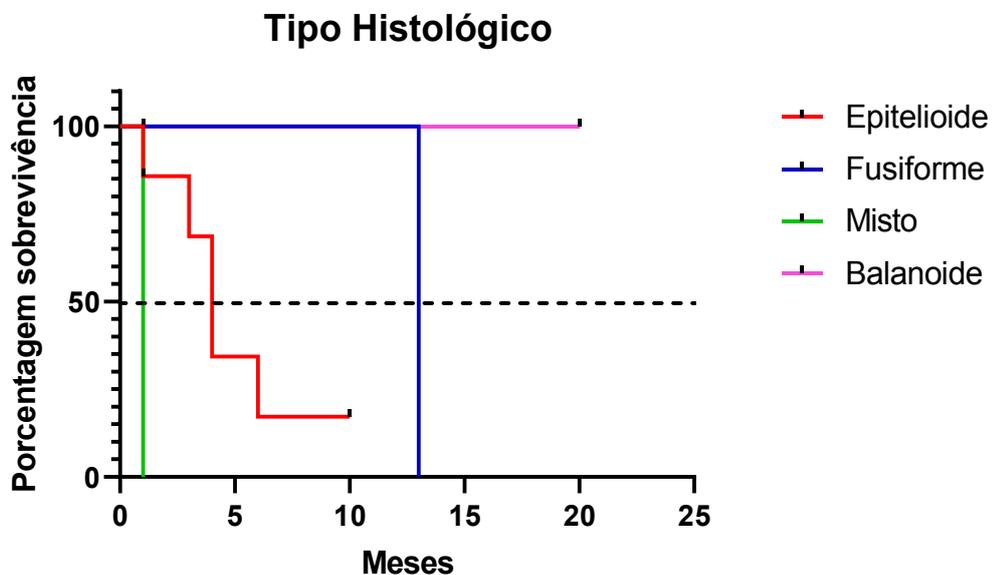


Figura 27. Comparação do tempo de sobrevida em animais com tumores classificados por tipo histológico.

Ao analisar a presença de êmbolos neoplásicos, observou-se que os animais com a presença desses êmbolos apresentaram um tempo de sobrevida significativamente menor, em comparação aos animais com tumores sem identificação de êmbolos neoplásicos no tumor primário ($p = 0,0128$) (Figura 28).

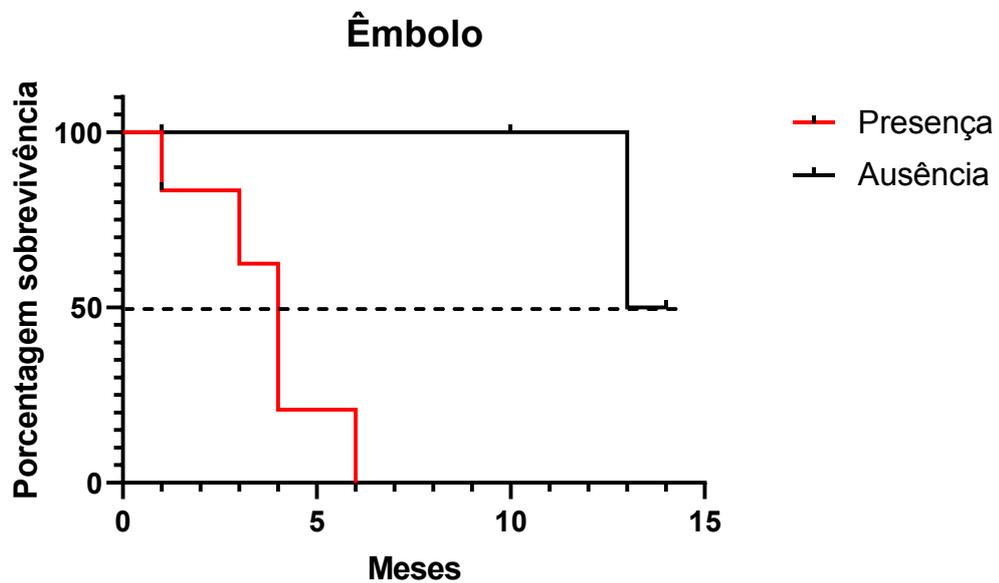


Figura 28. Comparação do tempo de sobrevida em animais com presença de êmbolos neoplásicos.

Observou-se que o tempo de sobrevida dos animais com desmoplasia foi menor em comparação aos animais que não apresentaram essa característica, atingindo a mediana em 6 meses, sem diferença estatística entre os grupos ($p = 0.5995$) (Figura 29).

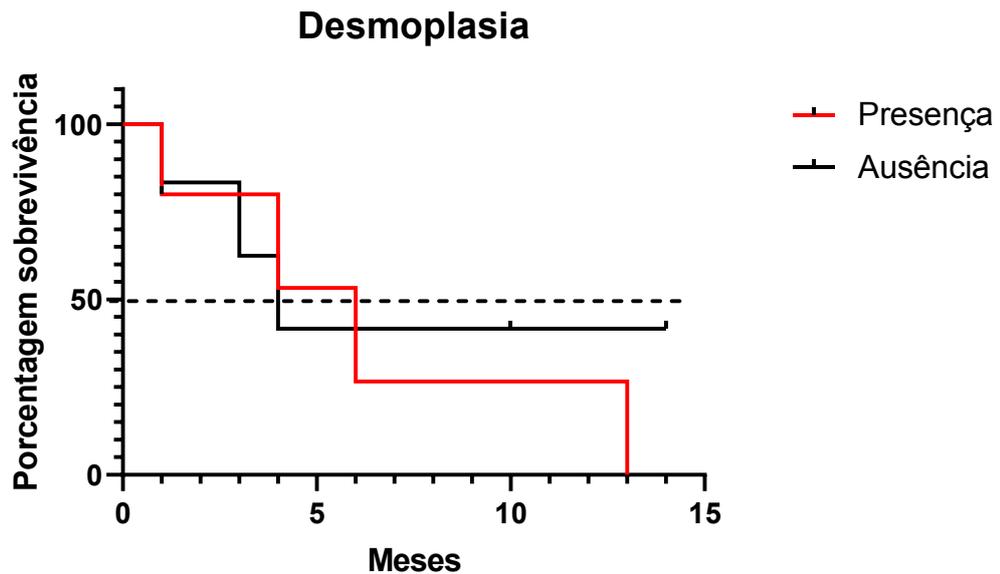


Figura 29. Comparação do tempo de sobrevivência em animais com e sem desmoplasia.

Foi realizada uma análise de sobrevivência dos tumores primários comparando a expressão de E-Caderina e N-Caderina, os quais foram categorizados em <50% e >50% de expressão. A análise da E-Caderina revelou um tempo de sobrevivência mais curto nos tumores que expressaram >50%, atingindo a mediana em 4 meses, em comparação aos tumores com <50% de expressão, que não alcançaram a mediana em 13 meses, mas sem significância estatística ($p= 0.1026$). Em contrapartida, observou-se um tempo significativamente menor de sobrevivência nos tumores que expressaram >50% de N-Caderina, com mediana de 4 meses, em contraste com os tumores <50% que não alcançaram a mediana até o final do acompanhamento ($p= 0.0410$) (Figura 30).

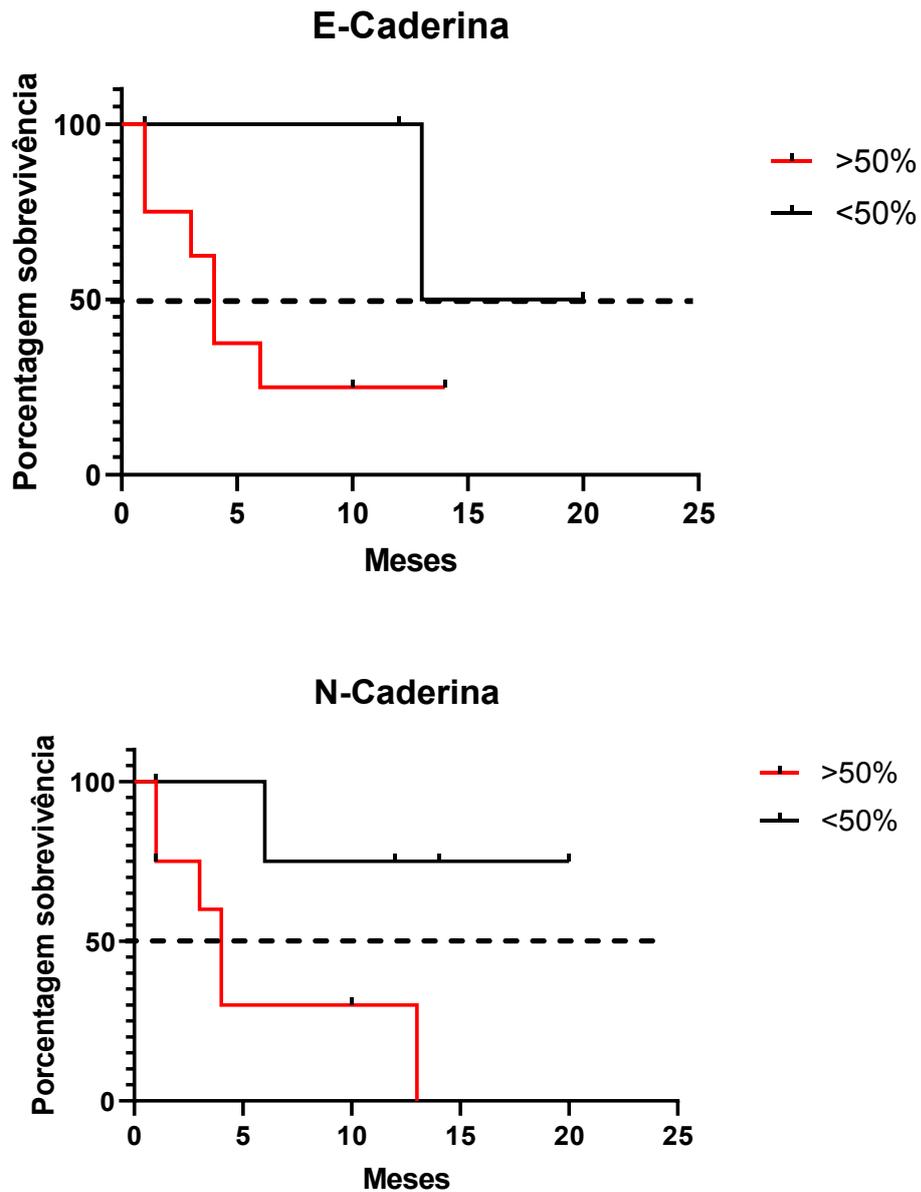


Figura 30. Comparação do tempo de sobrevida em tumores primários baseada na expressão de E-Caderina e N-Caderina.

6. DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho apresentam informações relevantes dentro do contexto clínico-diagnóstico de melanomas caninos. Atualmente existem poucos trabalhos que exploram a relação da sobrevida dos animais acometidos com os principais aspectos histopatológicos do melanoma, tanto oral quanto cutâneo. Além disso, a análise de marcadores moleculares envolvidos na TEM em melanomas ainda não foi explorada dentro do contexto de disseminação metastática e análise de sobrevida quando

avaliado melanomas caninos. Acreditamos que esses dados podem ser um passo fundamental para a definição dos possíveis marcadores histológicos prognósticos para esse tipo de doença, além de auxiliar na compreensão do papel da TEM na progressão dos melanomas na espécie canina.

A análise dos melanomas caninos revelou várias associações entre características histopatológicas, destacando diferenças importantes entre os melanomas metastáticos e não metastáticos. Inicialmente, ao considerar a pigmentação dos tumores, observou-se que a maioria dos melanomas metastáticos apresentou uma pigmentação abaixo de 50%. No entanto, não foram observadas diferenças significativas na frequência de pigmentação entre melanomas metastáticos e não metastáticos quando analisados separadamente por localização. Esses resultados corroboram os achados de Smendley e colaboradores, 2011, que apontam que a análise da pigmentação, de forma isolada, não é um fator prognóstico confiável, sendo necessária sua associação com outros achados histopatológicos.

No que diz respeito ao tipo histológico predominante, os melanomas orais, tanto metastáticos quanto não metastáticos, apresentaram predominantemente o tipo epitelíóide. Por outro lado, nos melanomas cutâneos, os tumores não metastáticos mostraram um predomínio do tipo misto, enquanto os tumores metastáticos foram mais frequentemente classificados como epitelíóide. Esses achados sugerem que o tipo histológico pode influenciar a propensão de um melanoma a metastatizar, com características epitelíóide possivelmente associadas a um comportamento mais agressivo e invasivo (Velo *et al.*, 2020).

A presença de êmbolos neoplásicos foi mais frequente em tumores metastáticos, mesmo que sem significância estatística, independentemente da localização. Isso indica que a formação de êmbolos está intimamente ligada à capacidade de um tumor se disseminar além do seu local primário, refletindo um potencial invasivo aumentado em melanomas metastáticos. A presença de êmbolos é um passo crucial na disseminação metastática das células neoplásicas, uma vez que estas atingem vasos sanguíneos ou linfáticos migrando para sítios distantes, sendo a vascularização tumoral um importante fator prognóstico independente (Leiter *et al.*, 2004).

Finalmente, a desmoplasia foi observada com alta frequência em todos os melanomas caninos analisados, independentemente de sua capacidade metastática ou localização. Isso sugere que a desmoplasia pode ser uma característica intrínseca aos melanomas caninos, influenciando o microambiente tumoral (Han *et al.*, 2012).

Os resultados deste estudo revelaram a importância da expressão das caderinas na progressão e metástase de melanomas caninos. A alta expressão de E-caderina (>50%) foi frequente tanto em tumores metastáticos quanto em não metastáticos, corroborando estudos anteriores em modelos animais (Silvestre *et al.*, 2020). Em contraste, a N-caderina apresentou maior expressão (>50%) em tumores primários metastáticos, sugerindo sua associação com a capacidade metastática dos melanomas, alinhando-se com a literatura sobre o papel da transição epitelial-mesenquimal (TEM) na disseminação tumoral (Veloso *et al.*, 2020).

A análise das correlações entre E-caderina e N-caderina revelou que, em tumores não metastáticos, não houve correlação significativa entre as expressões dessas proteínas. Entretanto, em tumores metastáticos primários, observou-se uma correlação positiva significativa, sugerindo uma interação complexa entre esses marcadores durante a metastatização, possivelmente refletindo uma transição epitelial-mesenquimal parcial (Veloso *et al.*, 2020; Pedri *et al.*, 2021). Esta transição é caracterizada pela manutenção de algumas características epiteliais, enquanto se adquirem propriedades mesenquimais, facilitando a invasão e disseminação tumoral (Han *et al.*, 2012; Lamouille, Xu, & Derynck, 2014).

Nos linfonodos metastáticos, a correlação entre E-caderina e N-caderina não foi significativa, indicando uma diminuição na expressão de N-caderina. Isso pode estar relacionado com a transição mesenquimal-epitelial, onde células neoplásicas adquirem um fenótipo epitelial para se aderirem ao novo sítio metastático como visto por Christiansen e colaboradores, 2006.

A localização do tumor mostrou-se um parâmetro relevante a ser considerado. Tumores não metastáticos orais apresentaram uma correlação positiva significativa entre E-caderina e N-caderina, sugerindo um aumento simultâneo dessas proteínas. Em melanomas cutâneos não metastáticos, a redução de E-caderina correlacionou-se com o aumento de N-caderina, um padrão associado à TEM e à progressão

tumoral. Estudos mostraram que melanomas cutâneos metastáticos, entretanto, exibiram uma correlação forte e significativa entre E-caderina e N-caderina (Blanco *et al.*, 2021).

A expressão de E-caderina e N-caderina variou significativamente dependendo do sítio tumoral e do estado metastático, refletindo a complexidade dos mecanismos de regulação na progressão do melanoma, indicando o processo de transição mesenquimal-epitelial, onde ao chegar no sítio metastático essas células neoplásicas param de expressar N-Caderina, e voltam a ter o perfil epitelial de aderência através da expressão de E-Caderina (Christiansen *et al.*, 2006).

A E-Caderina e a N-Caderina, são marcadores epiteliais e mesenquimais, respectivamente, parecem influenciar a morfologia predominante dos tumores, com o tipo epitelióide frequentemente associado a características mais diferenciadas. Semelhante ao tipo histológico, tumores com mais de 50% de expressão de E-caderina e N-caderina mostraram maior incidência de êmbolos neoplásicos, sugerindo um comportamento mais invasivo e metastático. Este achado indica o processo de transição epitelial-mesenquimal parcial, onde ocorre uma coexpressão de marcadores epiteliais e mesenquimais por estas células neoplásicas (Christiansen *et al.*, 2006).

A presença de úlceras foi predominante em tumores metastáticos com alta expressão de E-caderina e N-Caderina, indicando desorganização celular e comprometimento da barreira epitelial. Enquanto nos tumores não metastáticos foi observado uma elevada expressão de E-Caderina associada ao aparecimento de úlcera, os tumores com baixa expressão de N-Caderina também exibiram um predomínio na presença de ulceração. Ao contrário dos nossos resultados, foi visto que no melanoma humano, cutâneo e de mucosa, ocorre uma baixa expressão de E-caderina correlacionando com a localização de úlceras (Venza *et al.*, 2016).

Tumores com alta expressão de E-caderina exibiram maior necrose, semelhante a isto tumores com baixa expressão de N-caderina apresentaram também uma elevada presença de necrose. A alta frequência de desmoplasia em tumores com alta expressão de E-caderina e N-caderina sugere um papel na remodelação do microambiente tumoral. Estudos em câncer de pulmão de células não pequenas em humanos, observou uma redução da expressão de E-caderina com o aumento de

necrose, evidenciando que a expressão de E-caderina está associada a prognóstico favorável (Tsoukalas *et al.*, 2017).

Enquanto os melanomas não metastáticos alcançaram uma mediana de sobrevida aos 13 meses, os melanomas metastáticos apresentaram uma mediana significativamente reduzida de apenas 3 meses, isso corrobora com a literatura em relação aos tumores metastáticos que apresentam um pior prognóstico (Smedley *et al.*, 2011). Estudos indicam que a expressão elevada da N-Caderina está associada à progressão tumoral, conferindo às células neoplásicas um perfil mesenquimal e facilitando suas capacidades migratórias, o que promove a migração para locais distantes (Derycke & Bracke, 2004; Cao *et al.*, 2019; Pedri *et al.*, 2021).

Além disso, a pigmentação dos tumores mostrou-se como um fator prognóstico relevante. Tumores classificados com escore 1 para pigmento exibiram um tempo de sobrevida significativamente menor, atingindo a mediana em apenas 4 meses, em comparação com os tumores classificados com escore 2 ou ausência de pigmentação. Isso sugere que a presença e a intensidade da pigmentação podem estar associadas a diferentes características dos melanomas caninos, influenciando diretamente o curso da doença, porém isoladamente não é um marcador prognóstico confiável, devendo ser associado a outros achados histopatológicos (Smedley *et al.*, 2011).

O tipo histológico também demonstrou impacto no prognóstico dos animais estudados. Especificamente, os melanomas do tipo epitelióide foram associados a um tempo de sobrevida mais curto, alcançando a mediana em 4 meses, comparado aos tumores de padrão fusiforme. Embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística, a tendência observada sugere que a morfologia histológica pode refletir na agressividade e a progressão dos melanomas caninos. Apesar disso, poucos estudos sugerem que o tipo de célula predominante no tumor possa estar relacionado ao comportamento de maneira isolada. (Smedley *et al.*, 2011).

Na análise da presença de êmbolos neoplásicos, foi observada uma maior frequência em tumores com mais de 50% de expressão para E-Caderina. Da mesma forma, também foi notada uma maior frequência de êmbolos em tumores com mais de 50% de expressão para N-Caderina, permitindo um perfil mesenquimal as células neoplásicas e conseqüentemente conferindo maior capacidade migratória e invasão,

favorecendo a formação de êmbolos e a disseminação metastática como visto por Smedley e colaboradores, 2011, em seu consenso.

A presença de desmoplasia foi associada a um tempo de sobrevida significativamente reduzido, indicando que a fibrose estromal pode criar um microambiente tumoral favorável à progressão e à resistência terapêutica. Esse achado ressalta a importância de considerar não apenas as características do tumor em si, mas também o contexto microambiental no qual ele se desenvolve. Em tumores humanos, já foi descrito associação da recidiva do tumor com a presença de colágeno no microambiente tumoral (Chen *et al.*, 2021).

Os resultados indicaram que tumores com uma expressão elevada de E-Caderina (>50%) estão associados a um tempo de sobrevida mais curto, embora sem significância estatística, atingindo uma mediana de apenas 4 meses, em comparação com os tumores que expressaram <50% dessa proteína, que alcançaram uma mediana de sobrevida mais longa, atingindo 13 meses. Essa observação sugere que a alta expressão de E-Caderina pode estar correlacionada com uma maior agressividade tumoral e uma progressão mais rápida da doença. Paralelamente, a análise da expressão de N-Caderina também mostrou uma tendência similar, onde uma elevada expressão (>50%) apresentou um tempo de sobrevida significativamente mais curto ($p=0.0410$). Tumores com uma expressão elevada de N-Caderina (>50%) apresentaram uma mediana de sobrevida de 4 meses, enquanto aqueles com uma expressão menor (<50%) não atingiram a mediana em 6 meses. Esses resultados indicam uma possível associação entre a alta expressão de N-Caderina e uma menor sobrevida, além do processo de transição epitelial-mesenquimal parcial (Pedri *et al.*, 2021).

Pedri e colaboradores (2021) observaram um resultado semelhante, onde células circulantes de melanoma apresentavam uma coexpressão de E-Caderina e N-Caderina. Essas células neoplásicas migravam em pequenos clusters, indicando o processo de transição epitelial-mesenquimal parcial, caracterizado por um perfil híbrido na expressão das caderinas por essas células. Esse perfil híbrido é caracterizado por um maior risco de sofrer metástase, e conseqüentemente tempo de sobrevidas menores, quando comparado com as células que sofrem a transição epitelial-mesenquimal completa (Grosse-Wilde *et al.*, 2015).

7. CONCLUSÃO

A presença de metástases e de êmbolos tumorais são fatores cruciais a serem considerados na avaliação prognóstica de cães acometidos por melanomas. Este estudo também ressalta a complexidade da expressão de E-caderina e N-caderina em melanomas caninos, evidenciando variações significativas conforme o estado metastático e a localização do tumor. A elevada expressão de N-caderina em melanomas metastáticos sugere sua associação com a capacidade de disseminação metastática e pior sobrevida dos animais, enquanto a correlação entre E-caderina e N-caderina nesses tumores indica uma possível ocorrência de transição epitelial-mesenquimal parcial. Esses achados reforçam a importância de investigar esses marcadores como potenciais ferramentas terapêuticas e prognósticas no manejo do melanoma canino.

8. REFERÊNCIAS

1. BARRETO, H. M.; SÁ, M. A. F. Melanoma melanocítico oral em cão – revisão de literatura. *Revista Científica do UBM*, p. 245–261, 2017. DOI 10.52397/rcubm.v19i36.1015. Disponível em: <https://revista.ubm.br/index.php/revistacientifica/article/view/1015>. Acesso em: 31 mai. 2024.
2. CAO, Z. Q., Wang, Z., & Leng, P. (2019). Aberrant N-cadherin expression in cancer. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 118). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109320>
3. CHIANG, A. C.; MASSAGUÉ, J. Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 26, p. 2814–2823, 25 dez. 2008. DOI 10.1056/NEJMra0805239. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0805239>. Acesso em: 31 mai. 2024.
4. COLOMBO, K. C. et al. Melanoma de cavidade oral em cães: características epidemiológicas, clínicas e patológicas. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 13, p. e230111335332, 5 out. 2022. DOI [10.33448/rsd-v11i13.35332](https://doi.org/10.33448/rsd-v11i13.35332). Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/35332>. Acesso em: 31 mai. 2024.
5. GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 27, n. 1, p. 90–102, 1 nov. 2013. DOI 10.1111/PCMR.12170. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcmr.12170>. Acesso em: 31 mai. 2024.
6. MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. *New England Journal of Medicine*, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006. DOI 10.1056/NEJMra052166. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052166>. Acesso em: 31 mai. 2024.
7. PEDRI, D. et al. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *The FEBS Journal*, v. 289, n. 5, p. 1352–1368, 30 maio 2021. DOI 10.1111/febs.16021. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.16021>. Acesso em: 31 mai. 2024.

8. PROUTEAU; ANDRÉ. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes*, v. 10, n. 7, p. 501, 30 jun. 2019. DOI [10.3390/GENES10070501](https://doi.org/10.3390/GENES10070501) Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/7/501>. Acesso em: 31 mai. 2024.
9. MEDEIROS, A. S.; JORDÃO, L. A. A. R.; FIGUEREDO, C. R. L. V. O papel da transição epitélio-mesenquimal no potencial metastático de tumores malignos. *revista saúde & ciência*, v. 7, n. 2, p. 82–93, 30 ago. 2018. ISSN 2317-8469 versão *online*. Disponível em: <https://rsc.revistas.ufcg.edu.br/index.php/rsc/article/view/97>. Acesso em: 3 jun. 2024.
10. SILVEIRA, T. et al. Use of Giemsa staining for the immunohistochemical counterstaining in canine melanomas: an “old and forgotten” method. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 13, n. 1, p. 17–20, 31 mar. 2020. DOI [10.24070/bjvp.1983-0246.v13i1p17-20](https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v13i1p17-20). Disponível em: <https://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/03/v13-n1-3.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2024.
11. SILVESTRI, S. et al. E-Cadherin Expression in Canine Melanocytic Tumors: Histological, Immunohistochemical, and Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, v. 57, n. 5, p. 608–619, 24 jun. 2020. DOI [10.1177/0300985820934385](https://doi.org/10.1177/0300985820934385). Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985820934385>. Acesso em: 31 mai. 2024.
12. SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 54–72, jan. 2011. DOI [10.1177/0300985810390717](https://doi.org/10.1177/0300985810390717). Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810390717>. Acesso em: 31 mai. 2024.
13. VELOSO, E. S. et al. ZEB and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma. *Research in Veterinary Science*, v. 131, p. 7–14, 1 ago. 2020. DOI [10.1016/J.RVSC.2020.04.007](https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2020.04.007). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528819306630>. Acesso em: 31 mai. 2024.
14. HAO L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* [Internet]. 2012 Jun;166(6):1184–97. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2012.10824.x>
15. OLIVEIRA, I. O. DE; ALMEIDA JUNIOR, H. L. DE. Conhecimentos atuais sobre a biologia dos melanócitos no folículo piloso humano. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 78, n. 3, p. 331–343, jun. 2003.
16. ADMINISTRADOR. La biología del melanocito y su papel en la respuesta inmunitaria cutánea – *Dermatología Revista mexicana*. Disponível em: <https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/la-biologia-del-melanocito-y-su-papel-en-la-respuesta-inmunitaria-cutanea/>.
17. BENEDETTI, I.; REYES, N. Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *IATREIA*, v. 28, n. 4, 2015.

18. MIOT, L. D. B. et al. Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 6, p. 623–635, dez. 2009.
19. ARIS, M. Origen del melanocito normal y maligno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, v. 43, n. 3, p. 333–337, 1 set. 2009.
20. VIDEIRA, I. F. DOS S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 88, n. 1, p. 76–83, fev. 2013.
21. GARBE, C.; LEITER, U. Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, v. 27, n. 1, p. 3–9, jan. 2009.
22. JOÃO, C. F. et al. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. *Ciência Rural*, v. 41, n. 9, p. 1611–1616, set. 2011.
23. Câncer de pele melanoma. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-melanoma>>.
24. GANDINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, v. 41, n. 1, p. 45–60, 2005.
25. CLARK, W. H. et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Research*, v. 29, n. 3, p. 705–727, 1 mar. 1969.
26. BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of Surgery*, v. 172, n. 5, p. 902–908, 1 nov. 1970.
27. LI, L. T. et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 11, n. 3, p. 1566–1572, 10 nov. 2014.
29. DE NARDI, A. B. et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells*, v. 11, n. 4, p. 618, 10 fev. 2022.
30. BENEDETTI, I.; REYES, N. Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma prostático. *IATREIA*, v. 28, n. 4, 2015.
31. MARIE, P. J. Role of N-cadherin in bone formation. *Journal of Cellular Physiology*, v. 190, n. 3, p. 297–305, 8 fev. 2002.
32. HAZAN, R. B. et al. Cadherin Switch in Tumor Progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1014, n. 1, p. 155–163, abr. 2004.
33. POLTON, G., Brearley, M. J., & White, R. A. S. (2024). Oral malignant melanoma in dogs: 50 cases (1989-2017). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 264(2), 254-261. doi:10.2460/javma.264.2.254.

34. SIMPSON, R. M., Bastian, B. C., & Michael, K. M. (2014). Genetic mutations in human and canine melanoma. *Veterinary Pathology*, 51(1), 237-244. doi:10.1177/0300985813505879.
35. HERNANDEZ, B., Adissu, H. A., Wei, B. R., Michael, H. T., & Merlino, G. (2018). The challenge of modeling human cutaneous melanoma in vitro and in vivo in a genetically accurate and clinically relevant manner. *Frontiers in Oncology*, 8, Article 263. doi:10.3389/fonc.2018.00263.
36. LIMA, A. B., Gobello, C., Stéfano, J. T., & Prada, F. (2022). Immunohistochemical expression of Melan-A in canine melanocytic tumors: a useful tool for diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 34(3), 583-589. doi:10.1177/10406387211054075.
37. SCHULER, L., et al. (2016). "Proliferative activity in canine malignant melanoma assessed by Ki-67 and mitotic count." *Veterinary Pathology*, 53(6), 1235-1242.
38. GILLARD, J., et al. (2014). "Comparative aspects of canine and human melanomas." *Veterinary Comparative Oncology*, 12(1), 49-57.
39. SMEDLEY, R. C., et al. (2011). "Histopathological criteria for the diagnosis of canine oral melanomas." *Journal of Veterinary Pathology*, 48(3), 498-506.
40. LAPRIE C, Abadie J, Amardeilh MF, Net JL, Lagadic M, Delverdier M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol*. 2001 Jun;12(3):139-47. doi: 10.1046/j.1365-3164.2001.00236.x. PMID: 11420929.
41. CHEN W, Dong S, Liu X, Wang G, Xu S, Lei S, Zhuo S, Yan J. Association of the Collagen Signature in the Tumor Microenvironment With Recurrence and Survival of Patients With T4N0M0 Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*. 2021 May;64(5):563-575. doi: 10.1097/DCR.0000000000001907. PMID: 33538520.
42. LOPÉZ CADENA, Iván Darío; VICTORIA CHAPARRO, Jairo. Anatomía y Fisiología del Melanocito: revisión de tema. Disponível em: <https://es.studenta.com/content/133761081/anatomia-y-fisiologia-del-melanocito-pdf>. Acesso em: 19 jul. 2024.
43. CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Research*, v. 66, n. 17, p. 8319–8326, 1 set. 2006. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/66/17/8319>. Acesso em: 31 mai. 2024.
44. GUPTA, R.; JANOSTIAK, R.; WAJAPPEYEE, N. Transcriptional regulators and alterations that drive melanoma initiation and progression. *Oncogene*, 6 out. 2020.
45. KAUFHOLD, S.; BONAVIDA, B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 33, n. 1, 2 ago. 2014.

46. DEBNATH, P. et al. Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors. *Bioscience Reports*, v. 42, n. 1, 23 dez. 2021.
47. WISCO, O. J.; SOBER, A. J. Prognostic Factors for Melanoma. *Dermatologic Clinics*, v. 30, n. 3, p. 469–485, jul. 2012.
48. PEARLMAN, R. L. et al. Potential Therapeutic Targets of Epithelial-Mesenchymal Transition in Melanoma. *Cancer letters*, v. 391, p. 125–140, 10 abr. 2017.
49. TANG, Y. et al. EMT-Inducing Transcription Factors, Drivers of Melanoma Phenotype Switching, and Resistance to Treatment. *Cancers*, v. 12, n. 8, p. 2154, 4 ago. 2020.
50. MA, W. et al. Dermokine mutations contribute to epithelial-mesenchymal transition and advanced melanoma through ERK/MAPK pathways. *PloS One*, v. 18, n. 7, p. e0285806, 2023.
51. SCHADENDORF, D. MELANOMA. *The lancet*, v. 392, n. 10151, p. 971 A 984, 15 set. 2018.

Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido



LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR (LCC)

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-901

Universidade Federal de Minas Gerais/Instituto de Ciências Biológicas (UFMG/ICB)



Pesquisador responsável: Enio Ferreira

Fone: () _____ E-mail: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE MARCADORES TUMORAIS PROGNÓSTICO EM MELANOMAS CANINOS", que tem como objetivo avaliar e correlacionar a expressão de marcadores moleculares com o tempo de sobrevivência após diagnóstico. O motivo que nos leva a estudar é a falta de marcadores prognósticos em melanomas caninos que possam orientar uma melhor conduta terapêutica e uma maior predição de evolução dos pacientes acometidos.

Para este estudo serão solicitadas apenas 3 informações: estado atual do paciente (atualmente está vivo/faleceu), motivo do falecimento (eutanásia ou doença) e a data estimada do falecimento/eutanásia através de um formulário.

O (A) Sr. (a) será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para aceitar ou recusar-se a participar, retirando seu consentimento ou interrompendo sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e não representa nenhum custo e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada.

Em caso de obtenção de consentimento presencial:

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, na Universidade Federal de Minas Gerais e a outra será fornecida a(o) Sr. (a).



LABORATÓRIO DE COMPORTAMENTO CELULAR (LCC)

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, 31270-901

Universidade Federal de Minas Gerais/Instituto de Ciências Biológicas (UFMG/ICB)



Eu, _____, portador(a) do CPF _____, nascido (a) em ____/____/_____, residente no endereço _____, na cidade de _____, Estado _____, podendo ser contatado (a) pelo número telefônico () _____ e e-mail _____ fui informado (a) dos objetivos do estudo "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE MARCADORES TUMORAIS PROGNÓSTICO EM MELANOMAS CANINOS" de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Concordo que os materiais e as informações obtidas poderão ser utilizados em atividades de natureza acadêmico-científica, desde que assegurada a preservação de minha identidade. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim o desejar, de modo que declaro que concordo em participar desse estudo e recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

CIDADE/ESTADO, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

Anexo II. Artigo

Análise da transição epitelial-mesenquimal sob o comportamento metastático e caráter prognóstico em melanomas caninos

Thacyana Beatriz Guimarães LOPES¹, Daiana Yively Osorio TABORDA¹, Clarice Soares FENELON¹, Nayara de Oliveira DUARTE¹, Letícia Cristine Cardoso dos SANTOS², Karen Yumi Ribeiro NAKAGAKI³, Camila Costa ABREU⁴, Mayra Cunha FLECHER⁵, Helen Lima Del PUERTO¹, Enio FERREIRA¹.

¹ Laboratório do Comportamento Celular, ICB/ UFMG, Belo Horizonte/MG;

² Laboratório de Apoptose e Angiogenese, ICB/ UFMG, Belo Horizonte/MG;

³ CelulaVet – Centro de Diagnóstico Veterinário, Belo Horizonte/MG;

⁴ PatoVetVale – Patologia Veterinária do Vale, Taubaté/SP;

⁵ Universidade Vila Velha, Vila Velha/ES;

Autor Correspondente: Enio Ferreira – eniofvet@hotmail.com

Resumo

Os tumores melanocíticos em cães representam cerca de 7% das neoplasias malignas e têm um prognóstico ruim devido à alta taxa de metástase, afetando áreas como a cavidade oral e a pele. O diagnóstico precoce é mais viável em melanomas cutâneos, enquanto os orais costumam ser identificados tardiamente, com taxas de metástase pulmonar de 17% a 51%. A invasão tumoral está relacionada a alterações na adesão celular, especialmente através da Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM), que implica na perda de E-Caderina e no aumento de N-Caderina, conferindo características mesenquimatosas às células.

Este estudo analisou 32 melanomas caninos e seus linfonodos regionais para avaliar a expressão das proteínas E-Caderina e N-Caderina, correlacionando-as com a progressão tumoral e a sobrevida. Dos casos estudados, 53% eram metastáticos, com maior expressão de N-Caderina em melanomas metastáticos. Apesar da alta

expressão de E-Caderina em ambos os grupos, observou-se uma correlação positiva entre E-Caderina e N-Caderina em tumores primários metastáticos, mas não em suas metástases. Tumores não metastáticos apresentaram um tempo de sobrevida significativamente maior.

Os resultados indicam que a expressão de E-Caderina e N-Caderina varia conforme a localização do tumor e o estado metastático, ressaltando a necessidade de estudos adicionais sobre a TEM e a busca por marcadores terapêuticos e prognósticos. A localização do tumor é um fator relevante, destacando a complexidade da progressão do melanoma canino.

Palavras chaves: Melanoma, cão, transição epitelial-mesenquimal, E-Caderina, N-Caderina

1. INTRODUÇÃO

Tumores melanocíticos representam cerca de 7% de todas as neoplasias malignas em cães (Colombo *et al.*, 2022;). Aliado a isso, apresentam-se como um tipo de câncer com pior prognóstico devido sua alta incidência de metástase, acometendo a cavidade oral, cutânea, região sublingual e junções mucocutâneas (Gillard *et al.*, 2014; Barreto *et al.*, 2017; Prouteau & André, 2019). A localização dos tumores pode oferecer uma oportunidade para diagnóstico precoce, como é o caso dos melanomas cutâneos, que podem ser detectados em fases iniciais. Em contraste, melanomas orais em cães frequentemente são diagnosticados tardiamente e, exibem uma prevalência de metástases pulmonares variando de 17% a 51% (Prouteau & André, 2019). Aliado a isso, é reconhecido que a maioria das mortes por câncer está associada às consequências da lesão metastática (Chiang & Massagué, 2008; Medeiros *et al.*, 2018).

Como em diversos tipos de cânceres, a invasão e propagação de melanomas estão relacionadas a alterações na adesão celular, contribuindo significativamente para a invasão tumoral, interações tumor-estroma e sinalização das células tumorais (Miller *et al.*, 2006). Essa progressão tumoral está associada ao processo de transição epitelial-mesenquimal (TEM), que é um importante evento na disseminação de neoplasias (Pedri *et al.*, 2021).

A Transição Epitelial-Mesenquimal (TEM) se caracteriza pela transformação do fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal, nas células neoplásicas. Este processo é marcado pela alteração no perfil de expressão das caderinas pelas células neoplásicas. Consequentemente, essas células perdem a expressão de marcadores epiteliais de adesão, como a E-Caderina, enquanto ganham a expressão de marcadores mesenquimais, como a N-Caderina (Medeiros *et al.*, 2018). Isso resulta no fenótipo de célula mesenquimal, conferindo a essas células uma maior capacidade migratória, elevada resistência à apoptose e produção de componentes da matriz extracelular (MEC) (Veloso *et al.*, 2020; Pedri *et al.*, 2021).

Os melanócitos na camada basal da epiderme normalmente expressam E-Caderina, regulando a interação com os queratinócitos e prevenindo a proliferação descontrolada. Entretanto, os melanócitos neoplásicos podem perder a expressão de E-Caderina e adotar um perfil mesenquimal através da TEM. Este perfil mesenquimal

adquirido pelas células neoplásicas, está intimamente relacionado a invasão tumoral e a formação de metastase, uma vez que estas células perdem a interação com queratinócitos além de favorecer a sua adesão a fibroblatos e proteínas da matriz (MEC). (Cao et al., 2019; Silvestri et al., 2020). Por outro lado, a N-caderina, também conhecida como proteína CDH2, é uma proteína transmembrana essencial no desenvolvimento embrionário, especialmente em tecidos nervosos, cérebro, coração e outros órgãos. Em mamíferos adultos, sua expressão é limitada a tecidos nervosos, fibroblastos e células mesodérmicas. Apesar de ser normalmente expressa em níveis baixos em outros tipos celulares normais, sua elevação fora dos tecidos nervosos está ligada à progressão tumoral, conferindo às células neoplásicas características mesenquimais e facilitando a migração para locais distantes (Cao et al., 2019).

Apesar de ser reconhecido o fenômeno da TEM em diferentes tumores caninos e humanos, inclusive em melanomas, ainda é incerto a compreensão do seu comportamento durante a progressão dos melanomas caninos e sua relação com o prognóstico dos animais acometidos. Desta forma, o presente trabalho busca avaliar a expressão das proteínas envolvidas na TEM em melanomas primários e seus respectivos linfonodos metastáticos, com o objetivo de elucidar os mecanismos presentes na progressão tumoral do melanoma canino e sua relação com o tempo de sobrevivência desses animais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Espécimes

Foram analisados 32 casos de melanomas caninos e seus respectivos linfonodos regionais, obtidas a partir dos arquivos do Laboratório do Comportamento Celular (LCC) no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e de lesões obtidas de cães submetidas à exérese cirúrgica de diferentes clínicas de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo que foram encaminhadas ao LCC para diagnóstico histopatológico, entre 2015 e 2023.

2.2. Avaliação Histopatológica

Amostras histológicas de melanomas caninos, fixadas em formol neutro e tamponado a 10%, incluídas em parafina e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina foram analisados em microscopia óptica para caracterização histopatológica. Foi determinado o escore de pigmentação das lesões (0: ausência de células neoplásicas

pigmentadas a 2: células neoplásicas altamente pigmentadas), e avaliado a presença de êmbolo, atíпия, ulceração, desmoplasia, necrose, e atividade juncional (lentiginosa ou pagetoide) (Smedley *et al.*, 2011).

2.3. Imuno-Histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (Novolink Polymer Detection Sistem). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado a 125°C (Pascal® Pressure Cooker) com Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ou EDTA pH 9,0. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 15 minutos em Protein Block Serum-Free Ready to Use (Novolink Polymer Detection Sistem). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas e do cromógeno 3'-diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen system), de 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:20) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. (Silveira *et al.*, 2019).

Na Tabela I estão listadas as características do anticorpo e da reação. Para controle negativo foi omitida a etapa do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

Tabela I. Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imuno-histoquímico.

	Fabricante	Clone	Diluição	Tempo de Incubação	Recuperação Antigênica	Anticorpo Secundário
E-Caderina	Invitrogen	4A2C7	1:50	16h	EDTA + Pascoal	Novolink

N-Caderina	Dako	6G11	1:50	16h	Citrato + Pascoal	Novolink
Melan-A	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + Pascoal	Novolink
Melanoma Antigen	Santa Cruz	PNL-2	1:100	16h	Citrato + Pascoal	Novolink

2.4. INTERPRETAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUIMICA

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em objetiva de 400 (Olympus – BX41). Os anticorpos anti-Melan-A e anti-Melanoma Antigen (PNL-2) foram utilizados para comprovar o diagnóstico de melanoma nas amostras estudadas. Realizou-se a imuno-histoquímica para Melan-A em todos os casos e para Melanoma Antigen em todos os casos amelanóticos e para aqueles melanóticos que não apresentaram marcação para Melan-A. Foram considerados positivos os casos que apresentaram marcação citoplasmática em mais de 10% das células neoplásicas, para qualquer um dos marcadores (Smedley *et al.*, 2011).

A marcação de N-Caderina foi considerada independentemente da localização, além da marcação membranar e nuclear de E-caderina foram avaliadas nas células neoplásicas e classificadas segundo o percentual de células neoplásicas marcadas: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%). Tumores com escore 3 ou 4 foram considerados com alta expressão para as proteínas estudadas (Velo, *et al.*, 2020).

2.5. SOBREVIDA

O tempo de sobrevida foi definido (em meses) como sendo o período entre a data da exérese cirúrgica do tumor até a data de óbito do animal pela doença (end points). Os animais que vierem a óbito por razões desconhecidas ou causas não relacionadas ao tumor foram considerados censurados.

2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As associações e correlações foram avaliadas pelo Teste de Qui-Quadrado e Spearman respectivamente. As curvas de sobrevida foram derivadas da estimativa de Kaplan-Meier. Foram consideradas como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste foi <0.05 . As análises foram realizadas com auxílio do software de estatística Graph Pad Prism v. 8.0.2 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3. RESULTADOS

3.1. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS MELANOMAS CANINOS ORAIS E CUTÂNEOS.

Dos 32 casos analisados, 47% (15/32) são não metastáticos e 53% (17/32) metastáticos, destes casos, 59% (19/32) são orais, 41% (13/32) cutâneos as características histopatológicas das lesões estão apresentadas na Tabela II.

Tabela II. Características histopatológicas dos casos usados no estudo.

n= 32	Tumor Primário Metastático (n= 17)	Tumor Primário Não Metastático (n= 15)
Tipo Histológico		
Epiteloide	53%	47%
Fusiforme	12%	13%
Misto	29%	40%
Balanoide	6%	0%
Escore Pigmento		
0	12%	13%
1	47%	33%
2	18%	47%
3	24%	7%
Necrose		
0	6%	27%
1	94%	73%
Êmbolo linfático		
0	29%	53%

1	71%	47%
Atipia >20%		
0	0%	0%
1	100%	100%
Úlcera		
0	0%	20%
1	100%	80%
Desmoplasia		
0	24%	20%
1	76%	80%

3.2. EXPRESSÃO DE E-CADERINA EM MELANOMAS METASTÁTICOS E NÃO METASTÁTICOS.

Melanomas metastáticos e não metastáticos apresentaram frequentemente uma alta expressão de E-caderina (escore 3 ou 4). Ou seja, a maioria dos tumores apresentaram acima de 50% das células neoplásicas positivas para expressão dessa proteína (Figura I e Figura II).

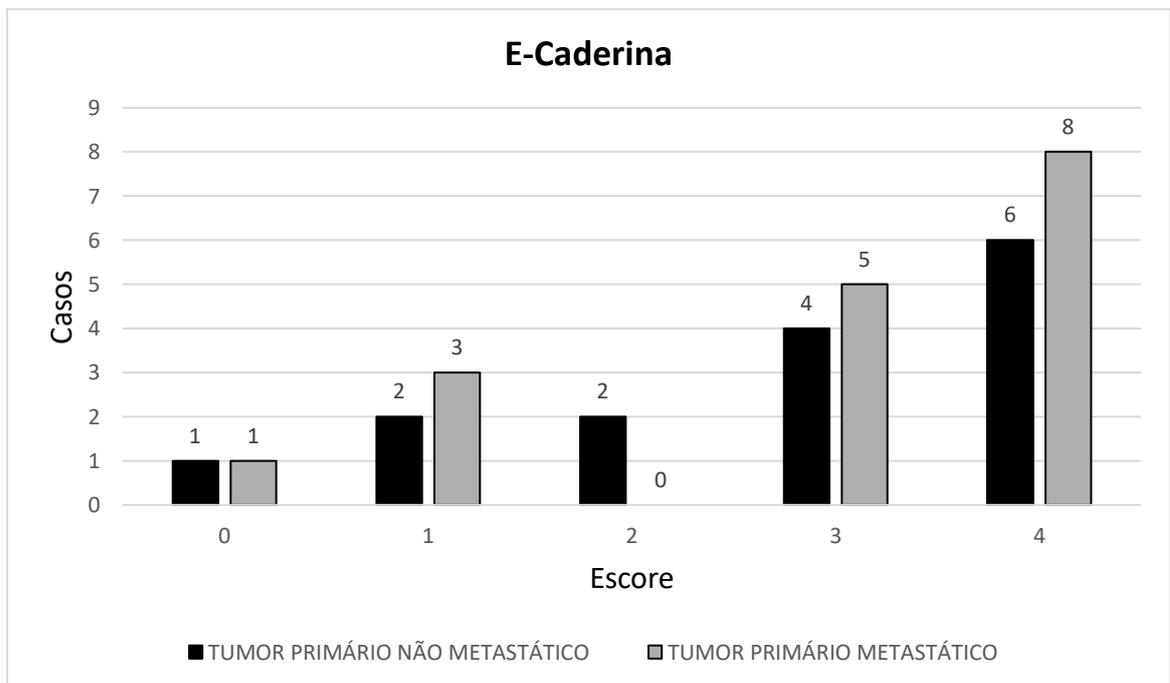


Figura I. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%).

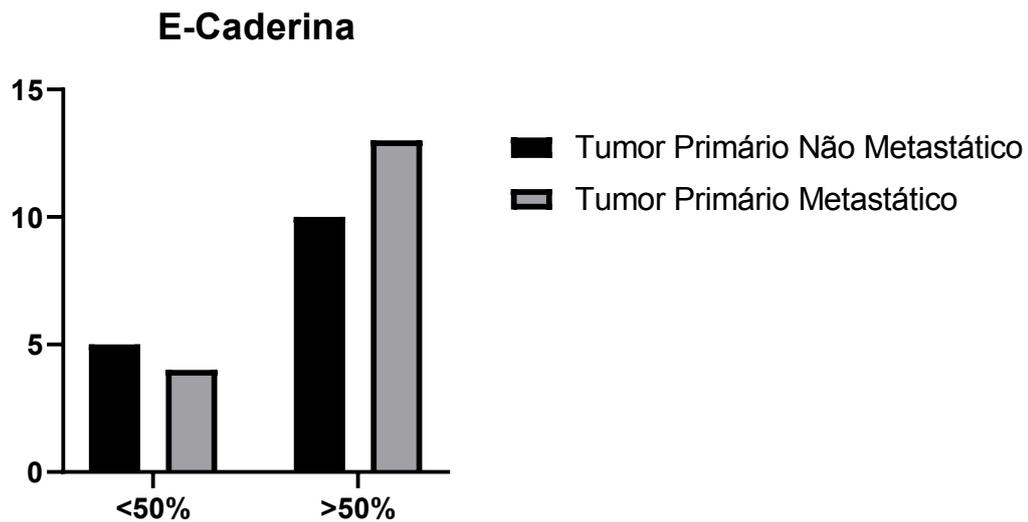


Figura II. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: escore 0, 1 ou 2, foram reclassificados como baixa expressão (<50%), e os que apresentaram escore entre 3 ou 4 como alta expressão (>50%). ($p=0.6989$).

3.3. EXPRESSÃO DE N-CADERINA NOS TUMORES PRIMÁRIOS METASTÁTICOS E NÃO METASTÁTICOS.

Dentre os tumores primários não metastáticos, foi observado uma maior frequência de tumores com baixa expressão de N-caderina (abaixo de 50% de expressão em células neoplásicas). De maneira contrária, os melanomas metastáticos apresentaram alta expressão de N-caderina na maioria dos casos, com expressão acima de 50% das células neoplásicas (Figura III). Tumores primários não metastáticos e metastáticos apresentaram diferença significativa em sua frequência de expressão acima de 50% das células para N-Caderina, 18.75% e 43.75% ($p=0.0269$) (Figura IV).

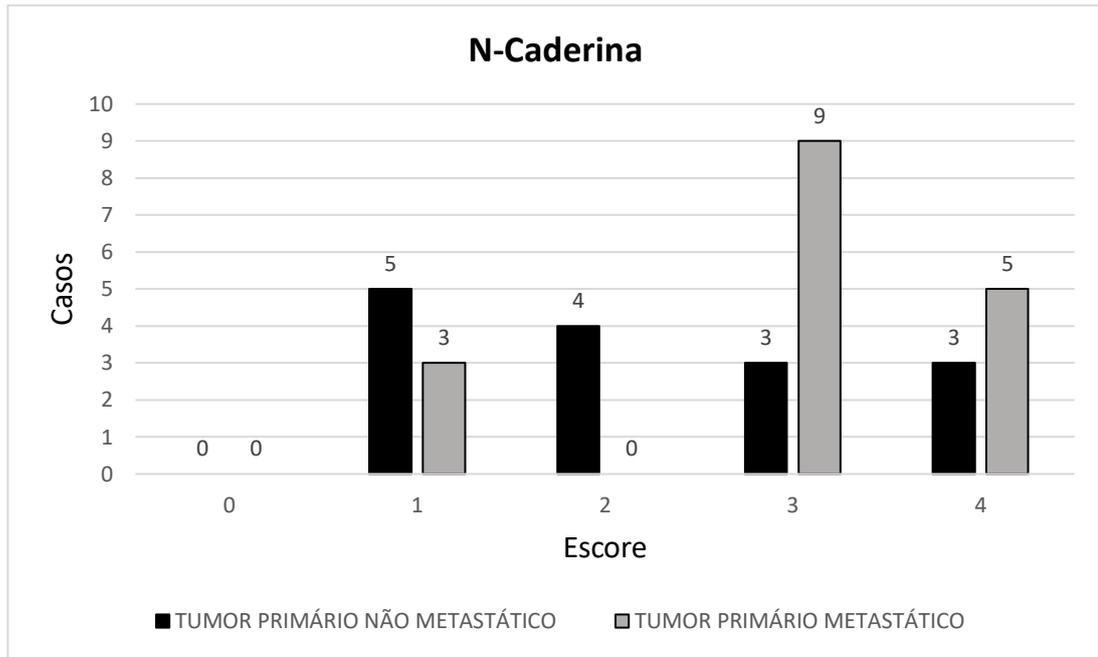


Figura III. Frequência de expressão de N-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (51-75%), 4 (>75%).

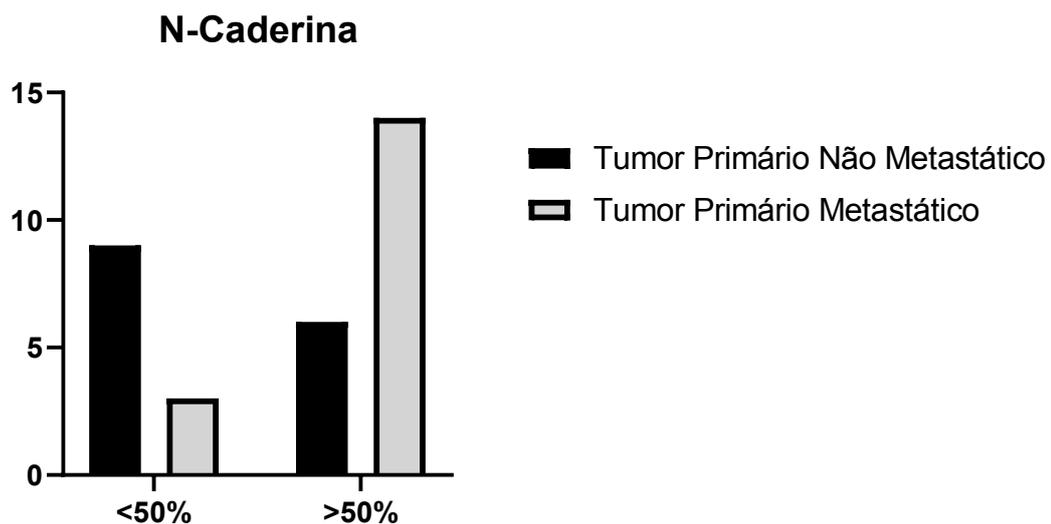


Figura IV. Frequência de expressão de E-Caderina nos Tumores Primários Não Metastáticos e Metastáticos, baseado no escore de expressão: escore 0, 1 ou 2, foram reclassificados como baixa expressão (<50%), e os que apresentaram escore entre 3 ou 4 como alta expressão (>50%). ($p=0.0269$).

3.4. CORRELAÇÃO ENTRE AS EXPRESSÕES DE E-CADERINA E N-CADERINA EM MELANOMAS CANINOS E SEUS LINFONODOS METASTÁTICOS.

Quando analisado os tumores primários metastáticos, foi observada uma correlação positiva entre a expressão de E-Caderina e N-Caderina ($r= 0.539$, $p= 0.025$). Tal correlação não é observada quando analisada a expressão dessas mesmas proteínas nas metástases linfonodais ($r= 0.247$, $p= 0.339$) ou em tumores não metastáticos ($r= 0.037$, $p= 0.895$).

Apesar de ser observada uma alta frequência de expressão das caderinas em tumores metastáticos e nas metástases linfáticas, não foi observada nenhuma correlação dessas proteínas entre tumores primários metastáticos e seus respectivos linfonodos regionais metastáticos. (Figura VI).

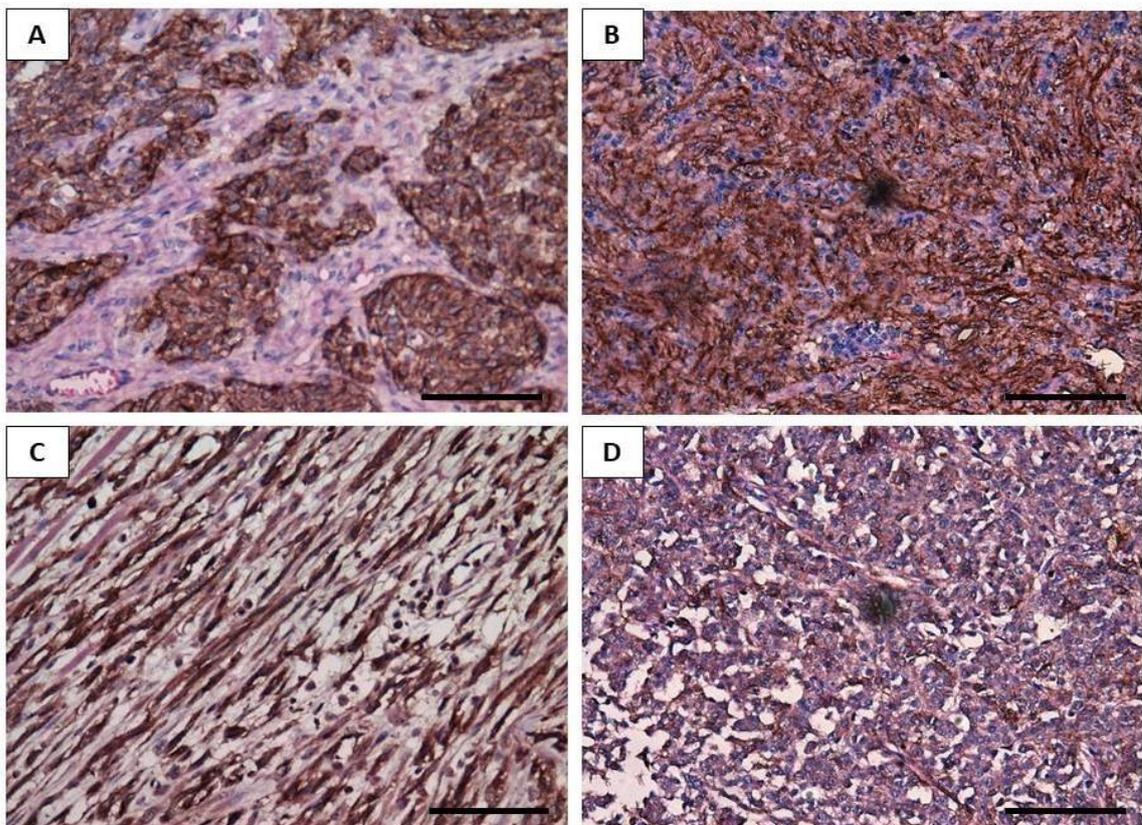


Figura VI. Imuno-histoquímica de E-Caderina e N-Caderina nos tumores primários e seus respectivos linfonodos regionais metastáticos no aumento de 40X (Escala 50 μ m). A) Forte marcação membranar de E-Caderina no tumor primário. B) Moderada marcação membranar de E-Caderina no linfonodo regional metastático. C) Forte marcação nuclear e citoplasmática de N-Caderina no tumor primário. D) Fraca marcação nuclear e citoplasmática de N-Caderina no linfonodo regional metastático.

Quando os tumores não metastáticos foram analisados de maneira independente, de acordo com a localização do tumor primário, foi observada uma correlação significativa entre as expressões de E-Caderina e N-Caderina em tumores primários não metastáticos orais ($r= 0.684$, $p= 0.042$). em tumores orais metastáticos não foi observada esse tipo de correlação.

De maneira inversa, em melanomas cutâneos não metastáticos, é observada uma correlação negativa entre esses marcadores, ($r= -0.926$, $p= 0.008$) demonstrando que, a maior expressão de E-Caderina está relacionado a uma menor expressão de N-Caderina nesses tumores. Em melanomas cutâneos metastáticos essa correlação se inverte, sendo observada uma correlação forte e estatisticamente significativa entre a expressão de E-Caderina e N-Caderina ($r= 0.776$, $p= 0.040$).

3.5. SOBREVIDA

Os resultados indicaram que os tumores primários não metastáticos apresentaram um tempo de sobrevida significativamente maior, animais com melanomas metastáticos atingem a mediana aos 3 dias, diferente dos animais com melanomas não metastáticos, que atingem a mediana nos aos 13 dias ($p=0.0141$) (Figura VII).

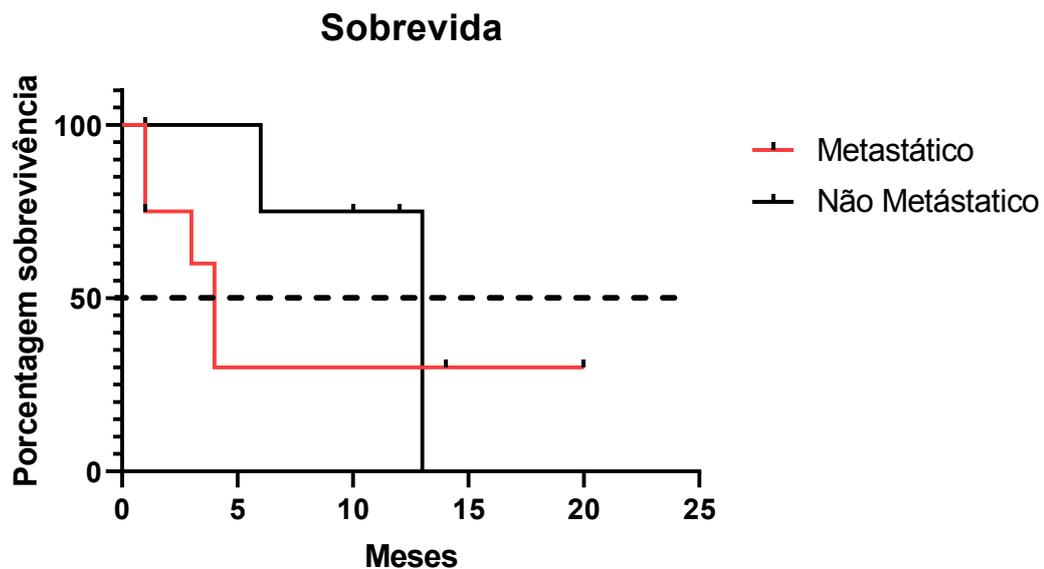


Figura VII. Análise de sobrevida em cães com melanoma não metastáticos e metastáticos. Os animais foram classificados em três categorias: 0 para aqueles que permaneciam vivos, 1 para os que morreram devido ao melanoma, e 2 para os censurados (morte por causas desconhecidas ou eutanasiados).

Foi realizada uma análise de sobrevida dos tumores primários comparando a expressão de E-Caderina e N-Caderina, os quais foram categorizados em <50% e >50% de expressão. A análise da E-Caderina revelou um tempo de sobrevida mais curto nos tumores que expressaram >50%, atingindo a mediana em 4 meses, em comparação aos tumores com <50% de expressão, que não alcançaram a mediana em 13 meses ($p= 0.1026$). Da mesma forma, observou-se um tempo significativamente menor de sobrevida nos tumores que expressaram >50% de N-Caderina, com mediana de 4 meses, em contraste com os tumores <50% que não alcançaram a mediana até o final do acompanhamento ($p= 0.0410$) (Figura VIII).

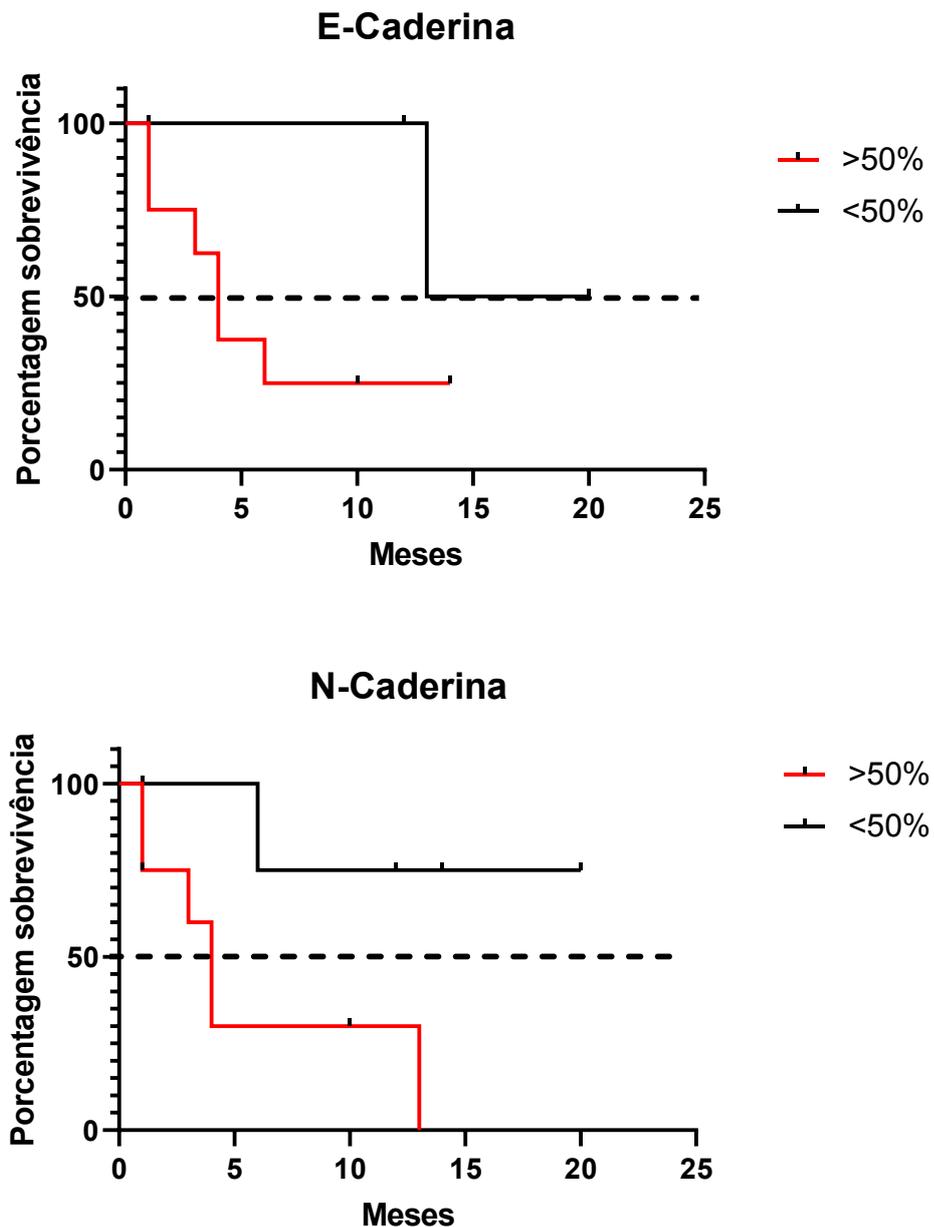


Figura VIII. Comparação do tempo de sobrevida em tumores primários baseada na expressão de E-Caderina e N-Caderina.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a alta expressão de E-caderina (>50%) é frequente tanto em tumores sem metástase quanto em tumores com metástase. Esses achados corroboram estudos anteriores em modelos animais, como em cães, onde a elevada expressão de E-caderina também é observada em animais com e sem recidivas (Silvestre *et al.*, 2020). Por outro lado, a N-caderina apresentou um comportamento diferente, com uma maior expressão (>50%) observada em tumores primários metastáticos em comparação com tumores primários não metastáticos. Esse resultado sugere que a expressão aumentada de N-caderina está associada à capacidade metastática dos melanomas primários, alinhando-se com a literatura que indica o papel da transição epitelial-mesenquimal (TEM) na disseminação tumoral em várias neoplasias (Veloso *et al.*, 2020; Pedri *et al.*, 2021).

Além disso, a análise das correlações entre E-caderina e N-caderina revelou que, em tumores não metastáticos, não houve uma correlação significativa entre as expressões dessas proteínas. Entretanto, em tumores primários metastáticos, observou-se uma correlação positiva significativa, indicando que nestes tumores, a maior expressão de E-caderina está associada à maior expressão de N-caderina. Este achado pode sugerir uma interação complexa entre esses marcadores durante o processo de metastatização, podendo ser justificado por um ganho de N-caderina sem perda da expressão de E-caderina, o que conhecemos como transição epitelial-mesenquimal parcial (Han *et al.*, 2012; Lamouille, Xu, & Derynck, R., 2014).

De acordo com o exposto, a transição epitelial-mesenquimal parcial foi um interessante achado neste trabalho, no qual o perfil epitelial é conservado e convertido em uma ferramenta de malignidade e agressividade (Veloso *et al.*, 2020; Vandyck *et al.*, 2021).

Quando analisamos os linfonodos metastáticos, não foi observada a mesma correlação entre E-caderina e N-caderina como nos tumores primários metastáticos, sendo vista uma diminuição, mesmo que não significativa, na expressão de N-caderina. Provavelmente este achado está relacionado com o processo de transição mesenquimal-epitelial, caracterizado pela alteração do fenótipo mesenquimal desta

célula neoplásica para um fenótipo epitelial, permitindo assim sua aderência ao novo sítio metastático (Christiansen *et al.*, 2006).

Ao analisar o tempo de sobrevida destes animais, os tumores não metastáticos alcançaram uma mediana de sobrevida aos 13 meses, os melanomas metastáticos apresentaram uma mediana significativamente reduzida de apenas 3 meses, isso corrobora com a literatura em relação aos tumores metastáticos que apresentam um pior prognóstico (Smedley *et al.*, 2011).

Quando comparado o tempo de sobrevida com a expressão dos marcadores envolvidos na TEM, os resultados indicaram que tumores com uma expressão elevada de E-Caderina (>50%) estão associados a um tempo de sobrevida mais curto, embora sem significância estatística, atingindo uma mediana de apenas 4 meses, em comparação com os tumores que expressaram <50% dessa proteína, que alcançaram uma mediana de sobrevida mais longa, atingindo 13 meses. Essa observação sugere que a alta expressão de E-Caderina pode estar correlacionada com uma maior agressividade tumoral e uma progressão mais rápida da doença. Paralelamente, a análise da expressão de N-Caderina também mostrou uma tendência similar, onde uma elevada expressão (>50%) apresentou um tempo de sobrevida significativamente mais curto ($p=0.0410$). Tumores com uma expressão elevada de N-Caderina (>50%) apresentaram uma mediana de sobrevida de 4 meses, enquanto aqueles com uma expressão menor (<50%) não atingiram a mediana em 6 meses. Esses resultados indicam uma possível associação entre a alta expressão de N-Caderina e uma menor sobrevida, além do processo de transição epitelial-mesenquimal parcial (Pedri *et al.*, 2021).

Pedri e colaboradores (2021) observaram um resultado semelhante, onde células circulantes de melanoma apresentavam uma coexpressão de E-Caderina e N-Caderina. Essas células neoplásicas migravam em pequenos clusters, indicando o processo de transição epitelial-mesenquimal parcial, caracterizado por um perfil híbrido na expressão das caderinas por essas células. Esse perfil híbrido é caracterizado por um maior risco de sofrer metástase, e conseqüentemente tempos de sobrevida menores, quando comparado com as células que sofrem a transição epitelial-mesenquimal completa (Grosse-Wilde *et al.*, 2015).

Esses achados ressaltam a importância do diagnóstico precoce e tratamento dos melanomas, podendo concluir que a presença de metástase é um fator em animais acometidos com melanomas caninos. Além disso, esse estudo destaca a complexidade da expressão de E-caderina e N-caderina em melanomas caninos, revelando variações significativas. A alta expressão de N-caderina em melanomas metastáticos sugere sua associação com a capacidade metastática, enquanto a correlação entre E-caderina e N-caderina nos tumores metastáticos aponta para uma possível transição epitelial-mesenquimal parcial. Esses achados enfatizam a importância de explorar esses marcadores como potenciais alvos terapêuticos e prognósticos no tratamento do melanoma canino.

5. REFERÊNCIAS

1. BARRETO, H. M.; SÁ, M. A. F. Melanoma melanocítico oral em cão – revisão de literatura. *Revista Científica do UBM*, p. 245–261, 2017. DOI: 10.52397/rcubm.v19i36.1015. Disponível em: <https://revista.ubm.br/index.php/revistacientifica/article/view/1015>. Acesso em: 31 maio 2024.
2. CAO, Z. Q.; WANG, Z.; LENG, P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 118, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109320.
3. CHIANG, A. C.; MASSAGUÉ, J. Molecular Basis of Metastasis. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 26, p. 2814–2823, 25 dez. 2008. DOI: 10.1056/NEJMra0805239. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0805239>. Acesso em: 31 maio 2024.
4. CHRISTIANSEN, J. J.; RAJASEKARAN, A. K. Reassessing Epithelial to Mesenchymal Transition as a Prerequisite for Carcinoma Invasion and Metastasis. *Cancer Research*, v. 66, n. 17, p. 8319–8326, 1 set. 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0410. Disponível em: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/66/17/8319>. Acesso em: 31 maio 2024.

5. COLOMBO, K. C. et al. Melanoma de cavidade oral em cães: características epidemiológicas, clínicas e patológicas. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 13, p. e230111335332, 5 out. 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i13.35332. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/35332>. Acesso em: 31 maio 2024.
6. GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 27, n. 1, p. 90–102, 1 nov. 2013. DOI: 10.1111/PCMR.12170. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcmr.12170>. Acesso em: 31 maio 2024.
7. HAN, J.-I. et al. Alteration in E-Cadherin/ β -Catenin Expression in Canine Melanotic Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 50, n. 2, p. 274–280, 15 ago. 2012. DOI: 10.1177/0300985812457792. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985812457792>. Acesso em: 31 maio 2024.
8. MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. *New England Journal of Medicine*, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006. DOI: 10.1056/NEJMra052166. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052166>. Acesso em: 31 maio 2024.
9. POLTON, G. et al. Melanoma of the dog and cat: consensus and guidelines. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 11, 5 abr. 2024. DOI: 10.3389/fvets.2024.1359426. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2024.1359426/full>. Acesso em: 31 maio 2024.
10. PEDRI, D. et al. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *The FEBS Journal*, v. 289, n. 5, p. 1352–1368, 30 maio 2021. DOI: 10.1111/febs.16021. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.16021>. Acesso em: 31 maio 2024.
11. PROUTEAU, L.; ANDRÉ, C. Canine Melanomas as Models for Human Melanomas: Clinical, Histological, and Genetic Comparison. *Genes*, v. 10, n. 7, p. 501, 30 jun. 2019. DOI: 10.3390/GENES10070501. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/7/501>. Acesso em: 31 maio 2024.

12. MEDEIROS, A. S.; JORDÃO, L. A. A. R.; FIGUEREDO, C. R. L. V. O papel da transição epitélio-mesenquimal no potencial metastático de tumores malignos. *Revista Saúde & Ciência*, v. 7, n. 2, p. 82–93, 30 ago. 2018. ISSN 2317-8469 versão online. Disponível em: <https://rsc.revistas.ufcg.edu.br/index.php/rsc/article/view/97>. Acesso em: 3 jun. 2024.
13. SILVEIRA, T. et al. Use of Giemsa staining for the immunohistochemical counterstaining in canine melanomas: an “old and forgotten” method. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 13, n. 1, p. 17–20, 31 mar. 2020. DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i1p17-20. Disponível em: <https://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2020/03/v13-n1-3.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2024.
14. SILVESTRI, S. et al. E-Cadherin Expression in Canine Melanocytic Tumors: Histological, Immunohistochemical, and Survival Analysis. *Veterinary Pathology*, v. 57, n. 5, p. 608–619, 24 jun. 2020. DOI: 10.1177/0300985820934385. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985820934385>. Acesso em: 31 maio 2024.
15. SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 54–72, jan. 2011. DOI: 10.1177/0300985810390717. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810390717>. Acesso em: 31 maio 2024.
16. VELOSO, E. S. et al. ZEB and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma. *Research in Veterinary Science*, v. 131, p. 7–14, 1 ago. 2020. DOI: 10.1016/J.RVSC.2020.04.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528819306630>. Acesso em: 31 maio 2024.
17. VANDYCK, H. H. et al. Repensando a biologia do melanoma metastático: uma abordagem holística. *Opiniões sobre câncer e metástase*, v. 40, p. 603–624, 2021. DOI: 10.1007/s10555-020-09895-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09895-5>. Acesso em: 31 maio 2024.
18. BLANCO, M. J. et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, v. 21, n. 20, p. 3241–3246,

maio 2002. DOI: 10.1038/sj.onc.1205416. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/1205416>

19. LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 15, n. 3, p. 178–196, mar. 2014. DOI: 10.1038/nrm3758. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3758>. Acesso em: 31 maio 2024.
20. YAN, S. et al. Epithelial–Mesenchymal Expression Phenotype of Primary Melanoma and Matched Metastases and Relationship with Overall Survival. *Anticancer Research*, v. 36, n. 12, p. 6449–6456, 1 dez. 2016.

6. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

7. CONTRIBUIÇÕES DO AUTOR

Todos os autores contribuíram para a concepção e desenho do estudo. A preparação do material e coleta foram realizadas pela Karen Yumi Ribeiro Nakagaki, Camila Costa Abreu e Mayra Cunha Flecher. Os experimentos foram realizados por Thacyana Beatriz Guimarães Lopes, Daiana Yively Osorio Taborda, Clarice Soares Fenelon, Nayara de Oliveira Duarte. As capturas das imagens foram realizadas por Thacyana Beatriz Guimarães Lopes, Daiana Yively Osorio Taborda, Clarice Soares Fenelon, Nayara de Oliveira Duarte e Letícia Cristine Cardoso dos Santos. As análises dos dados foram realizadas por Enio Ferreira, Thacyana Beatriz Guimarães Lopes e Daiana Yively Osorio Taborda. O primeiro rascunho do manuscrito foi escrito pela Thacyana Beatriz Guimarães Lopes e todos os autores comentaram as versões anteriores do manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 228/2023).