

**EMERSON SOARES VELOSO**

**ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E DE  
RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO EM  
MELANOMAS CUTÂNEOS E DE CAVIDADE ORAL EM CÃES**

**BELO HORIZONTE – MG  
FEVEREIRO DE 2018**



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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E DE  
RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO EM  
MELANOMAS CUTÂNEOS E DE CAVIDADE ORAL EM CÃES**

**BELO HORIZONTE – MG**

**FEVEREIRO DE 2018**

**EMERSON SOARES VELOSO**

**ANÁLISE DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA E DE  
RECEPTORES DE FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO EM  
MELANOMAS CUTÂNEOS E DE CAVIDADE ORAL EM CÃES**

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

Orientador: Prof. Dr. Enio Ferreira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helen Lima Del Puerto

**FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG**

**BELO HORIZONTE – MG**

**FEVEREIRO DE 2018**

V443a Veloso, Emerson Soares.  
Análise da transição Epitélio-mesênquima e de receptores de fator de crescimento epidérmico em Melanomas Cutâneos e de cavidade oral em cães [manuscrito]. / Emerson Soares Veloso. - - Belo Horizonte: 2018.  
95f.: il.  
Orientador (a): Enio Ferreira.  
Coorientador (a): Helen Lima Del Puerto.  
Área de concentração: Patologia.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Melanoma. 2. Caderinas. 3. Genes erbB-1. 4. Transição Epitelial-Mesenquimal. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Ferreira, Enio. II. Puerto, Helen Lima Del. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 360

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

## DEDICATÓRIA

*Os mais belos gestos de amor me foram cedidos no silêncio de um olhar, em sua simples  
presença e no mais sincero e incondicional apoio*

**Aos meus pais, Nair e Gervásio**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, responsáveis por toda a trajetória que até hoje consegui percorrer, que por toda as lutas e sacrifícios que tiveram e cuidado, dedicação e segurança a mim prestados propiciaram o caráter e coragem necessários para que eu pudesse tomar todas as minhas decisões.

Ao meu orientador e amigo, Enio Ferreira, pelo exemplo a ser seguido, oportunidade e confiança cedidas e todo conhecimento transmitido, além das agradáveis discussões sobre o projeto e tantos outros aspectos da vida.

À minha querida co-orientadora, Helen Lima, que em pouquíssimos minutos ao me conhecer já demonstrou um grande afeto e tem-me transmitido grandes conhecimentos, além de representar um belo exemplo de professora, bióloga e ser humano.

Ao professor Geovanni Cassali, pelo espaço e apoio cedidos e também pelo conhecimento e ideias compartilhadas.

À grande companheira de laboratório e irmã escolhida para a vida, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, que durante estes anos me proporcionou maravilhosos momentos e importantes mudanças, compartilhando também as frustrações (pessoais e profissionais).

Ao meu querido amigo, Gustavo César, uma amizade inicialmente improvável, mas que se tem mostrado sempre disponível para uma palavra de apoio, o fornecimento de uma risada e as distrações necessárias para me lembrar de que existe vida além da dissertação.

À querida amiga Istéfani, que me recebeu no laboratório e apresentou-me ao mundo da pesquisa em Patologia, sendo sempre um apoio e excelente ouvinte para ideias malucas.

Ao querido amigo Diego Reis, que também me recebeu e apresentou à pesquisa em Patologia e mesmo após períodos conturbados tornou-se, além de uma excelente companhia nos almoços, um grande confidente.

Aos queridos amigos Rachel, Clara, Anderson, Nayane, Matheus, Lílian e Nicole sempre uma fonte de apoio e orgulho, além de compartilhar ótimos momentos.

Aos amigos do LPC, Tatiany, Aline, Stéfane, Fernando, Déborah, Thamyris, Bruna, Larissa, Juliane, Ana('s), Júlia, Renato, Miriã, Fernanda, Malu, e todos os tantos outros que participaram do laboratório, pelos momentos compartilhados e experiências trocadas, especialmente aos IC's que tanto me auxiliaram neste projeto.

À equipe do Hospital Veterinário da UFMG, pelo apoio e amostras compartilhadas e aos pacientes e tutores que permitiram a realização deste trabalho.

A todos os professores e educadores que em algum momento contribuíram para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

***Muito Obrigado!!***

*“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”*

*Paulo Baleki*



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



## RESUMO

O melanoma é caracterizado pela proliferação anormal de melanócitos e constitui a neoplasia cutânea mais agressiva, tanto em cães quanto em humanos. Durante a progressão neoplásica dos melanomas observa-se a perda da interação com os queratinócitos do microambiente além de proliferação desordenada, características que em conjunto levam à invasão dos tecidos subjacentes. A reduzida interação observada entre melanócitos neoplásicos e queratinócitos deve-se a perda de expressão de E-caderina e ganho de N-caderina, que facilita a adesão a fibroblastos e células endoteliais, configurando a transição epitélio-mesênquima (TEM). Associado a isso, a proliferação desordenada está relacionada, dentre outros fatores, à superexpressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico, especialmente o EGFR. Estes eventos são bem descritos em melanomas humanos e melanomas murinos experimentais, porém poucos trabalhos sobre melanomas caninos abordam este tema. Assim neste trabalho objetivamos identificar a expressão e relação entre moléculas relacionadas a transição epitélio-mesênquima e receptores de fator de crescimento epidérmico com a progressão dos melanomas caninos orais e cutâneos. Nos casos estudados aproximadamente metade não apresentaram expressão de E-caderina enquanto que quase a totalidade apresentou expressão de N-caderina, que interessantemente foi observada também no citoplasma e núcleo das células neoplásicas. A expressão não-membranar de N-caderina foi associada com a presença do fator de transcrição ZEB1, enquanto que a N-caderina membranar associou-se com a expressão de ZEB2, já a associação entre o fator de transcrição Snail e a N-caderina parece ser alterada pela localização, oral ou cutânea, da lesão diferentemente do observado para os outros fatores estudados. O índice proliferativo das lesões cutâneas apresentou-se associado ao aumento da expressão citoplasmática de Her-4 e redução de EGFR e Her-3. Em lesões orais, a positividade de expressão membranar para Her-2 associou-se com a presença de êmbolos, entretanto não foi observada amplificação gênica do *ERBB2*. Assim nosso trabalho evidencia a ocorrência da TEM em melanomas caninos e ainda a translocação da proteína membranar N-caderina para citoplasma e núcleo, sendo este evento aparentemente regulado pelos fatores de transcrição ZEB e ainda a aparente participação de Her-4 no estímulo a proliferação e de EGFR e Her-3 no estímulo a diferenciação celular, além de relação entre Her-2 e a ocorrência de êmbolos neoplásicos.

**Palavras-Chave:** Melanoma; Caderinas; EGFR, Transição Epitélio-Mesênquima; Cão

## ABSTRACT

Melanoma is characterized by abnormal proliferation of melanocytes and constitutes the most aggressive cutaneous neoplasm in both dogs and humans. During a neoplastic progression of melanomas, there is loss of interaction of the microenvironment keratinocytes besides disordered proliferation, characteristics that together lead to invasion of the underlying tissues. The reduced interaction observed between neoplastic melanocytes and keratinocytes is due to loss of E-cadherin expression and N-cadherin gain, which facilitates adhesion to fibroblasts and endothelial cells, forming the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The disordered proliferation is associated, among other factors, with the overexpression of epidermal growth factor receptors, especially EGFR. These events are well described in human melanomas and experimental murine melanomas, but few studies on canine melanomas address this issue. Thus, in this work we aimed to identify the expression and relation between molecules related to epithelial-mesenchymal transition and epidermal growth factors receptors with the progression of canine, oral and cutaneous, melanoma. In the studied cases, approximately half of them did not present E-cadherin expression whereas almost all had N-cadherin expression, which was interestingly observed also in the cytoplasm and nucleus of the neoplastic cells. The non-membrane expression of N-cadherin was associated with the presence of the transcription factor ZEB1, whereas the membrane N-cadherin was associated with the expression of ZEB2, since the association between the Snail transcription factor and N-cadherin appears to be altered by the oral or cutaneous location of the lesion differently from that observed for the other factors studied. The proliferative index of cutaneous lesions was associated with increased Her-4 cytoplasmic expression and reduction of EGFR and Her-3. In the oral lesions Her-2 membrane expression was associated with the presence of emboli, however, no *ERBB2* gene amplification was observed. Thus, our work evidences the occurrence of EMT in canine melanomas and also the translocation of the N-cadherin membrane protein to cytoplasm and nucleus, which is apparently regulated by the ZEB transcription factors and the apparent participation of Her-4 in stimulating proliferation and of EGFR and Her-3 in stimulating cell differentiation, in addition to the relationship between Her-2 and the presence of neoplastic emboli.

**Key Words:** Melanoma; Cadherins; EGFR, Epithelial-Mesenchymal Transition; Dog

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imuno-histoquímico.....33

### Artigo 1

**Tabela 1.** Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário utilizados na técnica de imuno-histoquímica.....59

**Tabela 2.** Percentual das características histológicas analisadas por localização tumoral.....59

**Tabela 3.** *Cut-offs* determinados segundo média+desvio padrão com base nos resultados de todos os casos.....59

### Artigo 2

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica e suas características técnicas.....76

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo 1

- Figura 1.** Fragmento de melanoma canino, imuno-histoquímica para E-caderina e N-caderina.....55
- Figura 2.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de E-caderina.....55
- Figura 3.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de N-caderina.....56
- Figura 4.** Fragmento de melanoma canino, imuno-histoquímica para Snail, ZEB1, ZEB2 e Ki67.....56
- Figura 5.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de Snail, ZEB1 e ZEB2.....57
- Figura 6.** Gráfico. Percentual médio de expressão dos fatores de transcrição relacionados a transição epitélio-mesenquima.....57
- Figura 7.** Gráfico. Atividade proliferativa de melanomas caninos orais e cutâneos.....58

### Artigo 2

- Figura 1.** Fragmento de melanoma canino, imuno-histoquímica para EGFR e Her-2.....77
- Figura 2.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de EGFR e Her-2.....77
- Figura 3.** Fragmento de melanoma canino, imuno-histoquímica para Her-3 e Her-4.....78
- Figura 4.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de Her-3.....78
- Figura 5.** Gráfico. Expressão imuno-histoquímica de Her-4.....79
- Figura 6.** Fragmento de melanoma canino, hibridização *in situ* com revelação cromogênica para *ERBB2*.....79

## ABREVIATURAS E SIGLAS

CAMs: *Cellular Adhesion Molecules* (moléculas de adesão celular)

CETEA/CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal/Comissão de Ética no Uso de Animais

CISH: hibridização *in situ* com revelação cromogênica

CMA: campos de maior aumento

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAB: 3'3-diaminobenzidina

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF: *Epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

EGFR: *Epidermal growth factor receptor* (receptor de fator de crescimento epidérmico)

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

Her-2: *Human epidermal growth factor receptor-type 2* (receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2)

Her-3: *Human epidermal growth factor receptor-type 3* (receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 3)

Her-4: *Human epidermal growth factor receptor-type 4* (receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 4)

HGF: *Hepatocyte growth factor* (fator de crescimento de hepatócito)

HRP: enzima *horseradish peroxidase*

HV-UFGM: Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais

INCA: Instituto Nacional de Câncer

kDa: quilodáltons

MART-1: *melanoma antigen recognized by T-cells* (antígeno de melanoma reconhecido por células T)

Melan-A: *melanocyte antigen* (antígeno de melanócitos)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas)

OMS: Organização Mundial de Saúde

Snail: *Zinc Finger Factor Snail*

TEM: Transição epitélio-mesênquima

UFLA: Universidade Federal de Lavras

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: radiação ultravioleta

ZEB1: *Zinc Finger E-box-binding homeobox 1*

ZEB2: *Zinc Finger E-box-binding homeobox 2*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. O MELANÓCITO	15
2.2. O MELANOMA HUMANO	17
2.3. O MELANOMA CANINO	20
2.3.1. MARCADORES CLINICOPATOLÓGICOS EM MELANOMAS CANINOS	22
2.4. A Transição Epitélio-Mesênquima	24
2.5. Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico	27
2.6. Relação entre receptores de fator de crescimento epidérmico e a transição epitélio-mesênquima	29
3 JUSTIFICATIVA	30
4 HIPÓTESE	30
5 OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo Geral	31
5.2. Objetivos Específicos	31
6 MATERIAL E MÉTODOS	31
6.1. Aspectos Éticos	31
6.2. Espécimes	31
6.3. Avaliação Histopatológica	32
6.4. Imuno-histoquímica	32
6.5. Interpretação da Imuno-histoquímica	33
6.6. Hibridização <i>in situ</i> com Revelação Cromogênica	35
6.7. Análises Estatísticas	35
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
7.1. Artigo 1	37
7.2. Artigo 2	60
8 CONCLUSÕES	80
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
10 REFERÊNCIAS	83
11 ANEXO	94
11.1. Certificado de Aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais	94
11.2. Ata de Defesa da Dissertação	95

## 1. INTRODUÇÃO

A urbanização, industrialização e avanços científicos e tecnológicos vivenciados nas últimas décadas no cenário mundial e nacional propiciaram alterações no perfil demográfico populacional, com conseqüente aumento da expectativa de vida, o que em associação com o maior acesso aos serviços de saúde levou a redução de morbimortalidade por doenças infectocontagiosas, tornando as doenças crônico-degenerativas, em especial as neoplasias, um dos principais problemas de saúde pública atualmente (INCA, 2014; MARINI et al., 2008). Na medicina veterinária a ocorrência de neoplasias em cães também tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, sendo as neoplasias consideradas por alguns autores a principal causa de morte atualmente na espécie (MULAS; REYMUNDO, 2000; SORENMO et al., 2009).

No Brasil o câncer de pele, em humanos, é o mais frequentemente diagnosticado, correspondendo a 30% de todas as neoplasias malignas registradas, e o melanoma embora represente apenas 3% das neoplasias malignas da pele, constitui a principal causa de morte por câncer neste órgão (INCA, 2017).

O melanoma é caracterizado pela proliferação anormal de melanócitos acometendo epiderme, folículos capilares, trato uveal dos olhos e cóclea (SCHATTON; FRANK, 2008), constitui a neoplasia cutânea mais agressiva tanto em humanos quanto em cães (GROSS et al., 2005; MILLER; MIHM, 2006) sendo que o melanoma em cães partilha características clínicas, histopatológicas e moleculares com a contraparte humana (SIMPSON et al., 2014). O estudo oncológico nos cães, como modelo pré-clínico para neoplasias humanas, por se tratar de um modelo espontâneo e em animais imunocompetentes, representa diversas vantagens (HERNANDEZ et al., 2018) como a heterogeneidade tumoral interindividual e intratumoral, padrão de metástases e recidiva, e resistência terapêutica e ainda o fato de cães e humanos compartilharem o mesmo habitat, o que os expõe as mesmas características que podem influenciar na progressão tumoral (NISHIYA et al., 2016; PAOLONI; KHANNA, 2008).

Durante a progressão neoplásica dos melanomas observa-se perda da interação com os queratinócitos do microambiente além de proliferação desordenada, características que em conjunto levam à invasão aos tecidos subjacentes (ROBERT et al., 2006). Uma das possíveis explicações para a reduzida interação entre melanócitos neoplásicos e queratinócitos é a perda de expressão de E-caderina e ganho de N-caderina, que facilita a adesão a fibroblastos e células endoteliais, característica similar a observada na transição epitélio-mesênquima (TEM) (HAO



et al., 2012; KREIZENBECK et al., 2008), um fenômeno que também é observado durante a embriogênese quando os melanócitos migram da crista neural para a epiderme (TUCKER, 2004).

Estudos *in vitro* e *in silico*, com linhagens celulares de melanoma humano, demonstraram que os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR, Her-2, Her-3 e Her-4), codificados pelos genes *ERBB* (RIESE; STERN, 1998), são alvos promissores para o tratamento dos melanomas (TWORKOSKI et al., 2011). Em humanos a amplificação dos genes *ERBB* ou polissomia do cromossomo 7, onde se localiza o gene do EGFR, é correlacionada com pior prognóstico dos pacientes com melanoma (BOONE et al., 2011; RÁKOSY et al., 2007).

Sendo os melanomas, tanto em humano quanto em cães, uma das principais causas de morte por neoplasias tornam-se necessários trabalhos que avaliem tanto vias relacionadas ao estímulo a proliferação, como os receptores de fator de crescimento epidérmico, quanto aquelas relacionadas a invasão, como o propiciado pela TEM.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 - O Melanócito**

Durante a embriogênese as células da crista neural são capazes de se diferenciarem em diversas linhagens celulares, como neurônios periféricos, células endócrinas, ósseas, conjuntivas e melanoblastos (ANDERSON, 2000). Os melanoblastos, precursores dos melanócitos que se originam ainda na crista neural, migram pela via dorsolateral em direção a linha ventral média onde, em mamíferos, invadem a epiderme subjacente, proliferam-se e migram extensivamente por toda a epiderme e se diferenciam em melanócitos após estimulação pelos queratinócitos (STEEL; DAVIDSON; JACKSON, 1992; WILKIE; JORDAN; JACKSON, 2002). Mesmo nas fases adultas a homeostase dos melanócitos ainda é regulada pelos queratinócitos através da produção de fatores de crescimento e da adesão celular (HAASS; HERLYN, 2005). Além da epiderme os melanócitos podem ser encontrados ainda em folículos capilares, trato uveal dos olhos e cóclea (SCHATTON; FRANK, 2008).

Os melanócitos, cuja principal função é a produção de melanina, são células com citoplasma globoso localizadas na camada basal da epiderme, com processos dendríticos que se projetam para a camada espinhosa. Cada melanócito, por meio dos dendritos, interage com aproximadamente 36 queratinócitos distribuídos entre as camadas espinhosa e basal, formando

a “unidade de melanina epidérmica” e estão distribuídos em uma razão de 1:5 com os queratinócitos da camada basal (JIMBOW et al., 1976). A interação queratinócitos-melanócito, que regula a proliferação dos melanócitos, é mediada principalmente pela adesão promovida pela E-caderina, glicoproteína expressa por ambas as células sob condições fisiológicas, já em condições neoplásicas tem-se a perda da interação entre estas células porque os melanócitos passam a expressar a N-caderina (HSU et al., 1996).

Os melanosomos, organelas citoplasmáticas presentes no melanócito, são responsáveis pela síntese de melanina a partir da atividade da enzima tirosinase sobre a tirosina (SLOMINSKI et al., 2004). Com a produção de melanina os melanosomos se diferenciam em grânulos de melanina que migram pelos dendritos do melanócito e são liberados no citoplasma dos queratinócitos, onde protegem o núcleo da célula da ação da radiação ultravioleta (UV) (OSAWA, 2009).

A proliferação dos melanócitos, após estabelecidos na epiderme, pode ser dividida em 4 fases: (1) dissociação, onde perdem a adesão aos queratinócitos adjacentes e membrana basal, além de reduzirem os dendritos; (2) divisão; (3) migração; (4) reassociação e extensão dos dendritos, onde se aderem novamente aos queratinócitos e membrana basal (HAASS; HERLYN, 2005). Apesar de ser regulada pelos queratinócitos principalmente pela produção de fatores mitogênicos, como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (HIROBE, 2011) alguns autores já descreveram também a participação dos fatores de crescimento epidérmico (EGF) na proliferação dos melanócitos, bem como a expressão da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR) por estas células (GORDON-THOMSON; MASON; MOORE, 2001; MATTEI et al., 1994), onde o EGFR e Her-4 estão ligados também a migração dos melanócitos normais e neoplásicos (GORDON-THOMSON et al., 2005).

Diferentes marcadores celulares são sugeridos para a identificação de melanócitos, principalmente em melanomas amelanóticos. O Melan-A (*melanocyte antigen*) também conhecido como MART-1 (*melanoma antigen recognized by T-cells*), é uma proteína expressa especificamente por células produtoras de melanina, incluindo os melanócitos normais e neoplásicos da pele e retina, que foi descrita em 1994 por dois grupos distintos (COULIE et al., 1994; KAWAKAMI et al., 1994). Esta proteína é codificada pelo gene *MLANA* localizado no braço curto do cromossomo 9 (9p24.1), constituída por 118 aminoácidos, com um peso molecular de 22-24kDa e encontra-se distribuída nos melanosomos em seus diferentes estágios

de maturação, mas também em outras organelas e membrana plasmática do melanócito, sendo expressa em 90% dos melanomas primários e 80% dos metastáticos (DE MAZIERE et al., 2002). Outro importante anticorpo para detecção de melanócitos, especialmente os neoplásicos, é o PNL-2 (*melanoma marker*). Este anticorpo foi inicialmente desenvolvido para a identificação do receptor de somatostatina SST2 humano, entretanto possui alta afinidade por melanócitos (ROCHAIX et al., 2003) e teve sua sensibilidade e especificidade para diagnóstico de melanoma demonstrada por diversos trabalhos (AUNG et al., 2012; BUSAM et al., 2005; MORRIS et al., 2008; ROCHAIX et al., 2003).

## 2.2 - O Melanoma Humano

A incidência de melanoma, neoplasia maligna caracterizada pela proliferação anormal de melanócitos, tem aumentado nas últimas décadas (MACKIE; HAUSCHILD; EGGERMONT, 2009) e atualmente 132.000 novos pacientes são diagnosticados por ano no mundo (OMS, 2017). Algumas possíveis razões para este aumento da incidência são as mudanças no estilo de vida, com maior exposição intermitente à radiação UV, e a depleção da camada de ozônio, resultando em maiores quantidades de radiação UV na atmosfera terrestre, especialmente ao considerarmos que as alterações no estilo de vida iniciaram-se na década de 1950 e o desenvolvimento do melanoma pela exposição solar pode levar de 20 a 40 anos (LEBOIT et al., 2006).

O melanoma é considerado a neoplasia cutânea mais agressiva (MILLER; MIHM, 2006) e apesar da sua incidência aumentar com a idade, representa também uma importante neoplasia que acomete indivíduos jovens levando a considerável perda de anos potenciais de vida (BURNET et al., 2005). A *American Cancer Society's* estima que em 2018, nos Estados Unidos, serão diagnosticados 91.270 novos casos de melanoma e registradas 9.320 mortes em sua decorrência, sendo sua incidência 20 vezes maior em indivíduos brancos do que afro-americanos, visto que a presença de melanina protege os melanócitos e queratinócitos da ação dos raios UV, e o risco de desenvolver melanoma de 2.5% para indivíduos brancos, 0.5% para hispânicos e 0.1% para negros (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). No Brasil foram registradas 1547 mortes por melanoma no ano de 2013 e estimados 6260 novos casos para o ano de 2018 (INCA, 2017).

Segundo Clark e colaboradores, 1984 a carcinogênese dos melanomas se inicia com uma lesão genérica caracterizada pela proliferação focal e limitada de células benignas, o nevo melanocítico comum adquirido, seguido de uma proliferação com padrão anormal de crescimento celular e citologia aberrante em algumas células, em meio a uma proliferação de células benignas, caracterizando a displasia melanocítica. Após adquirirem autonomia quanto a proliferação celular e apresentarem crescimento expansivo acometendo somente a epiderme e camadas superiores da derme tem-se o melanoma em fase de crescimento horizontal, e com o ganho de propriedades invasivas com acometimento das camadas inferiores da derme e hipoderme tem-se o melanoma em fase de crescimento vertical, seguido a este quadro quando as células neoplásicas apresentam características que permitem sua migração e invasão para outros sítios tem-se o melanoma metastático (CLARK et al., 1984). Alguns dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma são pele e olhos claros, queimaduras solares/exposição excessiva a radiação solar, nevos melanocíticos e sardas, histórico familiar de melanoma e predisposição genética (INCA, 2016; LEBOIT et al., 2006).

Os melanomas são caracterizados histologicamente pela formação de ninhos de melanócitos, na epiderme e/ou derme, sendo que os melanócitos variam de tamanho, forma e distribuição, podendo apresentar morfologia fusiforme ou epitelióide com citoplasma abundante e núcleos alongados ou ovalados e nucléolos evidentes e, em casos de crescimento vertical, comprometimento das camadas inferiores da derme e hipoderme. É observado ainda, especialmente nos casos com morfologia fusiforme, a presença de atividade desmoplásica, onde os melanócitos neoplásicos são separados por fibras colágenas ou estroma (GOLDSCHMIDT et al., 1998; KIBBI; KLUGER; CHOI, 2016). O melanoma pode acometer a pele, trato uveal dos olhos, mucosas e leptomeninges (SCHATTON; FRANK, 2008), sendo as lesões que acometem a pele da região plantar, palmas das mãos e próximas às unhas subclassificados como melanoma acral (SHAW; KOEA, 1988).

A presença do pigmento melânico nas células neoplásicas, uma das principais características do melanoma, não é observada em 2-20% dos casos, caracterizando o melanoma amelanótico (MCCLAIN et al., 2012). Os melanomas amelanóticos apresentam no momento do diagnóstico um pior estadiamento (MOREAU; WEISSFELD; FERRIS, 2013), além de apresentarem menor sobrevida e um crescimento mais acelerado que os melanomas melanóticos (THOMAS et al., 2014).

Os casos amelanóticos possuem um maior número de diagnósticos diferenciais possíveis tornando, por vezes, necessária a utilização de identificação imunohistoquímica (OHSIE et al., 2008; THOMAS et al., 2014), que é realizada principalmente através da pesquisa da expressão de Melan-A e PNL-2 (AUNG et al., 2012; DE MAZIERE et al., 2002; MORRIS et al., 2008).

Os dois principais parâmetros para avaliação do melanoma são os níveis de Clark e o índice de Breslow, sendo que ambos retratam a extensão dos melanomas. Os níveis de Clark são definidos de acordo com as camadas da pele acometidas pela lesão: nível I: crescimento intraepidérmico; nível II: invasão da derme papilar; nível III: comprometimento da junção derme papilar/derme reticular; nível IV: invasão da derme reticular; nível V: invasão do tecido subcutâneo (CLARK et al., 1969). Já o índice de Breslow é definido a partir da mensuração, em milímetros, da distância entre a camada granulosa da epiderme ou em caso de úlcera da célula mais superficial até a célula neoplásica mais profunda (BRESLOW, 1970). Atualmente o nível de Clark é adotado apenas em tumores com espessura <1mm (BALCH et al., 2001).

Para o estadiamento dos melanomas segundo o sistema TNM, principal parâmetro clinicopatológico para avaliação prognóstica, o *American Joint Committee on Cancer* determina que segundo o tamanho da neoplasia (T) esta deve ser classificada em T1 se  $\leq 1$ mm; T2: se 1 a 2mm; T3: se 2 a 4mm e T4: se  $>4$ mm (GERSHENWALD et al., 2017). Neste parâmetro existem ainda subcategorias determinadas pela ausência (a) ou presença (b) de úlceras, sendo a presença de úlceras um marcador de pior prognóstico onde a sobrevida de um paciente com um tumor ulcerado é semelhante a sobrevida de um paciente com um tumor não ulcerado de um estádio acima (IN'T HOUT et al., 2012). A taxa de sobrevida por 5 e 10 anos de pacientes com tumores T1a sem metástases regionais é de 99% e 98% respectivamente, já de pacientes com tumores T4b sem metástases regionais é de 82% e 75% respectivamente (GERSHENWALD et al., 2017).

As metástases regionais (N), aquelas que acometem os linfonodos que realizam a drenagem linfática da região acometida pela neoplasia, são classificadas quanto ao número de linfonodos acometidos (N1: 1 linfonodo; N2: 2-3 linfonodos; N3: 4 ou mais linfonodos), além de subclassificados em N<sub>x</sub>a se estas metástases são clinicamente indetectáveis ou N<sub>x</sub>b se clinicamente detectáveis, sendo as clinicamente detectáveis de pior prognóstico (BALCH et al., 2010).

As metástases a distância (M) são classificadas quanto a sua ausência (M0) ou presença (M1), sendo subclassificadas segundo a localização anatômica em M1a: pele, tecidos moles

(incluindo músculos) e linfonodos não-regionais; M1b: pulmão; M1c: outros órgãos, exceto sistema nervoso central; M1d: sistema nervoso central. A categoria M1d foi recentemente incluída na classificação por apresentar pior prognóstico que todos os outros sítios (GOLDBERG et al., 2016).

A caracterização da atividade proliferativa dos tumores pode influenciar no prognóstico dos pacientes (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000) sendo inclusive uma importante ferramenta no tratamento (KAUSCH et al., 2003). Neste contexto a estimativa do índice proliferativo de neoplasias é realizada através da identificação imuno-histoquímica de Ki67, uma proteína nuclear não-histona expressa em todas as fases do ciclo celular (G1-M) mas não nas células em repouso (G0) (BROWN; GATTER, 2002; GERDES et al., 1983). Em melanomas o índice proliferativo comumente é utilizado para diferenciação de melanocitomas (WANDLER et al., 2016) porém também apresenta um papel prognóstico (KORABIOWSKA et al., 2000; MA et al., 2017; NIELSEN et al., 2013).

Outro indicador de proliferação é o índice mitótico, que também reflete pior prognóstico, sendo a sobrevida por 5 anos de pacientes com tumores menores que 1mm, sem metástases regionais e com <1 mitose por mm<sup>2</sup> de 99%, já em pacientes com tumores do mesmo estadió, porém com >11 mitoses por mm<sup>2</sup> a taxa de sobrevida cai para 84% (MANDALÀ et al., 2016; THOMPSON et al., 2011).

### **2.3 - O Melanoma Canino**

Os melanomas caninos por compartilharem características clínicas, histopatológicas e moleculares com a contraparte humana são propostos como modelos comparativos oncológicos pré-clínicos (SIMPSON et al., 2014), algumas interessantes características compartilhadas são a heterogeneidade tumoral, padrão de ocorrência de metástases e recidivas e exposição aos mesmos fatores ambientais (NISHIYA et al., 2016; PAOLONI; KHANNA, 2008), além disso os melanomas caninos são manifestações espontâneas em animais imunocompetentes, ao contrário dos modelos murinos onde é necessário a indução da formação neoplásica e por vezes a imunossupressão do animal (HERNANDEZ et al., 2018). Eles representam 7% das neoplasias cutâneas caninas (SILVA, 2013), e são considerados a neoplasia mais comum da cavidade oral e olhos (MALHO et al., 2013), sendo os melanomas orais clinicamente considerados mais agressivos e com pior prognóstico e mesmo com tratamento cirúrgico, quimioterápico e

radioterápico a sobrevivida por mais de um ano corresponde a apenas 10% dos casos (GROSS et al., 2005).

Similarmente ao observado em humanos, os melanomas caninos também possuem diferentes graus de pigmentação e para confirmação diagnóstica de melanomas amelanóticos se faz necessária a utilização de imuno-histoquímica para Melan-A e PNL-2 (GIUDICE et al., 2010; ROLIM et al., 2012; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Apresentam também pouca resposta aos quimioterápicos convencionais (BROCKLEY; COOPER; BENNETT, 2013), reduzida sobrevivida quando diagnosticados tardiamente (GROSS et al., 2005), e elevado índice de metástases, especialmente para as lesões orais (BERGMAN, 2013).

As raças de cães mais comumente afetadas são Scottish, Boston e Airedale Terries, Cocker Spaniel, Schnauzers, Doberman Pinchers, Irish Setters, Vzsas, Golden Retrievers e Chow Chows, porém a verdadeira incidência por raça ainda não é bem estabelecida (BERGMAN, 2013). Na realidade brasileira o diagnóstico dessa neoplasia geralmente ocorre em animais adultos a idosos, machos, sem raça definida e de pelagem escura (TEIXEIRA et al., 2010).

Os fatores envolvidos com a carcinogênese do melanoma em cães ainda são controversos (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999), mas acredita-se que ela esteja envolvida com consanguinidade, traumas, exposição química, susceptibilidade genética (evidenciada pela maior incidência em determinadas raças) e fatores hormonais (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Os melanomas caninos, assim como em humanos, apresentam-se como uma proliferação de melanócitos anaplásicos, pigmentados ou não, formando ninhos, com perda da relação núcleo/citoplasma, nucléolos evidentes e, por vezes, acometimento das camadas basais da epiderme. Em cães existem 3 classificações histopatológicas para os melanomas, a depender da morfologia e distribuição dos melanócitos neoplásicos: a) epitelióide: quando as células neoplásicas reproduzem o fenótipo das células epiteliais; b) fusiforme: quando as células neoplásicas têm morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos; e c) misto: quando os dois padrões celulares são observados (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

O estadiamento dos melanomas caninos difere de acordo com a localização da lesão, sendo os parâmetros para melanomas orais melhor padronizados na literatura pelas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) a partir do sistema TNM. Segundo o tamanho (T) a lesão deve ser classificada em T1: se <2cm de diâmetro; T2: se entre 2 a 4cm de diâmetro e T3: se >4cm de diâmetro, neste parâmetro avalia-se ainda a ausência (a) ou presença (b) de invasão óssea. Quanto ao estado dos linfonodos regionais (N) a lesão é classificada em N0: sem

evidência de metástases; N1: linfonodos ipsilaterais acometidos por metástases; N2: linfonodos contralaterais acometidos por metástases e N3: linfonodos englobados pela massa tumoral primária, e quanto a metástases distantes a lesão é classificada em M0 se ausentes e M1 se presentes. A partir desta classificação os melanomas são classificados em 4 estádios: I, quando menores que 2cm, sem evidência de metástases (T1N0M0); II, quando entre 2 a 4cm sem evidência de metástases (T2N0M0); III, quando maior que 4cm sem evidência de metástases (T3N0M0) ou quando apresentarem metástases no linfonodo ipsilateral (T1,2,3N1M0) e IV, quando apresentarem metástases no linfonodo contralateral ou quando englobados pela massa primária (T1,2,3N2,3M0) ou ainda quando apresentaram metástases distantes (T1,2,3N1,2,3M1), sendo que quanto maior o estádio menor é a sobrevida observada, porém este sistema ainda não é amplamente utilizado e em alguns centros os estádios são feitos com algumas adaptações (BERGMAN, 2007; NISHIYA et al., 2016).

### **2.3.1 - Marcadores Clinicopatológicos Prognósticos em Melanomas Caninos**

Um dos principais parâmetros para determinação prognóstica dos melanomas em cães é a localização neoplásica, sendo aqueles que acometem a cavidade oral ou lábios considerados de pior prognóstico (BERGMAN, 2007) e indicado por muitos na literatura que todas as lesões orais melanocíticas devem ser clinicamente consideradas malignas (RAMOS-VARA et al., 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Em estudo conduzido por Spangler e colaboradores observou-se uma média de sobrevida consideravelmente menor para as lesões orais (147 dias) quando comparados com as lesões cutâneas (725 dias) (SPANGLER; KASS, 2006). Dentre as lesões cutâneas aquelas que acometem os dígitos têm sido consideradas de pior prognóstico, com a sobrevida por 2 anos para as lesões de dígitos sendo de 56% enquanto que para as lesões cutâneas é de 83.8% (LAPRIE et al., 2001).

A atipia nuclear, caracterizada pela presença de cromatina frouxa e nucléolos múltiplos e proeminentes, por vezes podendo apresentarem-se aglomerados dando ao núcleo aspecto de vacuolização, é outro importante marcador prognóstico, porém de difícil interpretação devido a subjetividade da avaliação (SPANGLER; KASS, 2006). Bergin e colaboradores elaboraram, para lesões orais e de lábios, um escore que leva em consideração o percentual de núcleos atípicos em 200 células neoplásicas onde índices superiores a 30% estavam associados a pior prognóstico (BERGIN et al., 2011), esta avaliação, entretanto, assim como qualquer outra forma de avaliação nuclear, é prejudicada nos melanomas fusiformes devido a morfologia nuclear comprimida. Em lesões cutâneas, avaliando-se de maneira subjetiva foi demonstrado



que índices superiores a 20% de núcleos neoplásicos atípicos representa pior prognóstico (LAPRIE et al., 2001).

Por se tratar de uma neoplasia melanocítica é de conhecimento que aquelas que se apresentam padrão amelanótico representam neoplasias menos diferenciadas, entretanto, no aspecto dos melanomas, isto não representa necessariamente um pior prognóstico, visto que é descrito a associação entre tumores pigmentados e maior tempo de sobrevida, tanto para lesões orais (ESPLIN, 2008) quanto cutâneas (LAPRIE et al., 2001), porém não existe associação significativa entre a ausência de pigmentos e menor sobrevida (BERGIN et al., 2011).

A presença de ulcerações também é discutida por alguns autores como um possível marcador prognóstico, porém para as lesões orais não foi observado associação entre a presença de úlceras e o tempo de sobrevida (HAHN et al., 1994; SCHULTHEISS, 2006), já para as lesões cutâneas existem trabalhos demonstrando tanto a associação entre a presença de úlceras e menor sobrevida (LAPRIE et al., 2001) quanto trabalhos que não observaram associação estatística entre estas características.

A avaliação do índice mitótico também apresenta importante valor prognóstico. A principal forma de avaliação do índice mitótico utilizada consiste na quantificação do número de mitoses em 10 campos de maior aumento, com determinação do número médio de mitoses por campo (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Nas lesões orais >4 mitoses por campo relacionam-se a aumento do risco de morte com 1 ano de diagnóstico (BERGIN et al., 2011) e nas lesões cutâneas >3 mitoses por campo estão associadas a reduzida taxa de sobrevida por 2 anos (BOSTOCK, 1979; LAPRIE et al., 2001).

A atividade proliferativa do tumor, que pode ser determinado por meio da imuno-histoquímica para a proteína Ki67, também integra um dos principais marcadores prognósticos disponíveis atualmente para os melanomas caninos. O índice de Ki67 foi demonstrado como sendo significativamente maior nas lesões daqueles animais que não sobreviveram por mais de 1 ano em comparação aos que sobreviveram, estando ainda este índice associado a menor sobrevida, permitindo a determinação de um *cut-off* de 19,5%, onde lesões com índice de Ki67 maior que este valor representam pior prognóstico (BERGIN et al., 2011). Já para as lesões cutâneas estudos similares demonstraram que o *cut-off* ideal é de 15% e também possui associação com menor sobrevida (LAPRIE et al., 2001).

## 2.4 - A Transição Epitélio-Mesênquima

As células epiteliais e mesenquimais são diferenciadas principalmente pela sua morfologia, mas apresentam também funções e proteomas diferentes. Os tecidos epiteliais são compostos em geral por uma única camada de célula disposta uniformemente e fortemente aderidas por diferentes complexos de adesão, como junções aderentes e junções comunicantes, desmossomas e zônulas oclusivas, mantendo-as como uma estrutura rígida e com a polarização das regiões basal e apical bem definida. As células mesenquimais não apresentam uma organização ou adesão celular tão definida e se dispõem de forma mais alongada que as células epiteliais (SHOOK; KELLER, 2003). Enquanto as células epiteliais se movimentam em blocos ou camadas, as células mesenquimais apresentam um potencial de migração mais dinâmico, podendo se movimentar de forma individual (LEE et al., 2006).

A transição epitélio-mesênquima (TEM) é um fenômeno que ocorre principalmente no subfiló dos Vertebrata caracterizado por alterações genótípicas e fenótípicas que conferem as células epiteliais características de células mesenquimais, o que favorece a migração e promove maior resistência a apoptose (FORONI et al., 2012; SIGURDSSON et al., 2011; THIERY, 2002). Este conceito foi cunhado na embriologia, mas atualmente é utilizado também na oncologia no âmbito do estudo da progressão tumoral e formação de metástases (KALLURI; WEINBERG, 2009).

São descritos 3 tipos de TEM. A TEM tipo 1 se refere a transição durante a fase embrionária, onde, após adquirirem fenótipo mesenquimal as células participam dos processos embrionários que envolvem migração celular (implantação, formação do embrião, gastrulação e migração da crista neural), além de serem progenitoras de epitélios secundários em órgãos mesodérmicos e endodérmicos, onde sofrem a transição mesenquimal-epitelial para reconstituírem o fenótipo epitelial. A TEM tipo 2 é aquela envolvida com processos fibróticos e regeneração, onde estimuladas pela inflamação crônica as células epiteliais sofrem TEM para gerar células com características de fibroblastos. A TEM tipo 3 é a que acomete as células neoplásicas, em especial as da frente tumoral, que com a alteração fenotípica sofrida conseguem, com maior facilidade, invadir tecidos adjacentes e migrar pela circulação sanguínea e linfática favorecendo a formação de metástases com a implantação das células neoplásicas em sítios distantes onde por vezes estas células sofrem a transição mesenquimal-epitelial para se aderirem novamente (ACLOQUE et al., 2009; WANG; ZHOU, 2011).

Alguns autores relatam ainda a ocorrência parcial da TEM em células neoplásicas, resultando em células com um fenótipo híbrido epitelial/mesenquimal, onde as células mantêm tanto características epiteliais quanto mesenquimais (CHRISTIANSEN; RAJASEKARAN, 2006; KLYMKOWSKY; SAVAGNER, 2009). As células com este perfil mantem a capacidade migratória das mesenquimais, porém, assim como as células epiteliais, migram em pequenos *clusters* (ARMSTRONG et al., 2011) o que representa, em comparação com as células que sofreram a “TEM completa”, um elevado risco de formação de metástases (GROSSE-WILDE et al., 2015).

Um dos principais eventos que ocorrem durante a TEM é a alteração da adesão célula-célula e célula-matriz. Esta adesão, fisiologicamente, ocorre por meio da ligação intercelular entre o citoesqueleto das células ou entre o citoesqueleto e componentes da matriz extracelular e é mediada pelas moléculas de adesão celular (CAMs), que são glicoproteínas transmembranares com um domínio intracelular, um transmembranar e outro extracelular dependentes de cálcio, como as caderinas, integrinas, selectinas, mucinas e superfamília de imunoglobulinas (GUAN, 2015; LODISH et al., 2000).

Durante a TEM do tipo 3 a principal alteração observada é denominada “*cadherin switch*” que é caracterizada pela mudança no perfil de caderinas expressas pela célula neoplásica, que perde a expressão de marcadores epiteliais de adesão, como a E-caderina, e ganha a expressão de marcadores mesenquimais de adesão, como a N-caderina (HAO et al., 2012).

A superfamília das caderinas é composta, além das caderinas clássicas, por protocaderinas, desmogleínas e desmocolinas (ANGST; MARCOZZI; MAGEE, 2001; HULPIAU; VAN ROY, 2009). Nos anos 2000 existiam mais de 100 membros da superfamília identificados e sequenciados (TEPASS et al., 2000) sendo atualmente encontradas no *GeneBank* do NCBI mais de 1100 anotações de genes e suas variantes de proteínas deste grupo. Os membros desta superfamília são, em sua maioria, moléculas de adesão celular cálcio-dependentes, que promovem a adesão celular a partir da interação homofílica com as proteínas de células adjacentes (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014; FOTY; STEINBERG, 2004). Existem mais de 20 caderinas clássicas descritas sendo as principais e mais estudadas a E-caderina, expressa em células epiteliais, e a N-caderina, expressa em células mesenquimais (ALIZADEH; SHIRI; FARSINEJAD, 2014; LI; FENG, 2011).

A E-caderina, também designada como CAM120/80, caderina epitelial, ou CD324 é codificada pelo gene *CDH1* que em cães se localiza no cromossomo 5 e apresenta 16 éxons e em humanos

no braço longo do cromossomo 16 (16q22.1) e possui 18 éxons, existindo ortologia entre o gene nestas 2 espécies. Em humanos a proteína é composta por 647 aminoácidos, possui peso molecular de 106kDa e apresenta 5 regiões (EC1-EC5) que funcionam como sítio de ligação para íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas do citoesqueleto (PRIEST; SHAFRAZ; SIVASANKAR, 2017). A redução da expressão de E-caderina é associada a várias doenças cutâneas e comportamento invasivo e metastático de tumores epiteliais, já que a perda da expressão desta molécula permite a invasão estromal (FURUKAWA et al., 1997). A redução ou ausência de expressão deste marcador pode ser considerado um marcador de malignidade para diversas neoplasias (BERX; ROY, 2001).

A N-caderina, também conhecida como caderina do tipo 2, caderina neural ou CD325 é codificada pelo gene *CDH2*, localizado em cães no cromossomo 7 com 16 éxons e em humanos no braço longo do cromossomo 18 (18q12.1) com 19 éxons e também existe ortologia entre o gene de cães e humanos. Em humanos possui peso molecular de 99,7kDa e é composta por 906 aminoácidos e assim como a E-caderina também apresenta 5 regiões que funcionam como sítio de ligação para íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas do citoesqueleto (SHAPIRO et al., 1995). Em neoplasias o ganho de expressão de N-caderina está associado a maior adesão a fibroblastos e células endoteliais e promove também a ativação da via anti-apoptótica Akt/PKB e inativação da via pró-apoptótica associada a BCL-2 (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001).

Os melanócitos são células que se originam na crista neural e durante a embriogênese migram para a epiderme. Para que esta migração ocorra é necessário que os melanócitos sofram a TEM do tipo 1 (TUCKER, 2004). Os melanócitos no seu estado fisiológico possuem expressão de E-caderina e não apresentam N-caderina (FANG; HERLYN, 2006) e este perfil determina a localização do melanócito na epiderme além de promover a interação entre queratinócitos e melanócitos, o que permite a regulação da homeostase dos melanócitos (NISHIMURA et al., 1999). Os melanócitos neoplásicos apresentam reduzida interação com os queratinócitos devido à perda de expressão de E-caderina, o que permite uma proliferação desordenada e invasão (HAASS; HERLYN, 2005; ROBERT et al., 2006).

A redução da expressão de E-caderina e o ganho de N-caderina foram associados em estudo *in vitro* com linhagens celulares de melanoma à invasão celular e promoção de metástases (HSU et al., 2000; LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2001), sendo em melanomas cutâneos humanos estes eventos considerados marcadores de pior prognóstico (ALONSO et al., 2007; KREIZENBECK et al., 2008; KRENGEL et al., 2004; TUCCI et al., 2007).

Em melanomas caninos poucos trabalhos abordam a TEM, sendo descrita uma reduzida expressão de E-caderina em melanomas orais em relação a mucosa normal (PISAMAI et al., 2017) e a expressão de E-caderina mantida em apenas 27% dos casos de melanoma cutâneo e 17% dos orais (HAN et al., 2012).

A regulação da expressão de moléculas relacionadas a TEM, em humanos, ocorre principalmente pelos fatores de transcrição das famílias *Zinc-Finger E-box Binding* (ZEB1 e ZEB2), *Snail* (Snail, Slug, Smuc) e *Basic Helix-Loop-Helix* (Twist1 e Twist2), que atuam promovendo a expressão de genes relacionados ao perfil mesenquimal e inibindo aqueles ligados ao perfil epitelial (DENECKER et al., 2014; PEINADO; OLMEDA; CANO, 2007), sendo que em modelos murinos a expressão de ZEB1 está associada ao estímulo à TEM e progressão neoplásica (DOU et al., 2014). Diversos são os estímulos relacionados a ocorrência da TEM, dentre eles a sinalização por EGF (*epidermal growth factor*), sendo a superexpressão do seu receptor (EGFR) associada a ativação de vias moleculares que culminam com a ativação dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2 (THOMAS et al., 2012).

## **2.5 - Receptores de Fator de Crescimento Epidérmico**

Os receptores de fator de crescimento epidérmico, codificados pelos genes *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3* e *ERBB4*, são proteínas transmembranares compostas por um domínio extracelular, um transmembranar e outro intracelular/citoplasmático com atividade cinásica (FRY et al., 2009) que participam da regulação da morfogênese, proliferação, migração e adesão celular (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001). Com a ligação do EGF ao domínio extracelular tem-se alterações conformacionais que levam a formação de homodímeros ou heterodímeros entre os receptores e consequente ativação da atividade cinásica da porção citoplasmática dos receptores, promovendo vias de sinalização intracelulares que levam a proliferação e diferenciação celular (MARMOR; SKARIA; YARDEN, 2004). Após estas reações os receptores são internalizados por endocitose a fim de evitar estimulação continuada e podem ser reciclados e retornarem a membrana citoplasmática ou serem degradados nos lisossomos (SEAMAN; BURD; EMR, 1996; WILEY, 2003). Atualmente são descritos 4 receptores: Her-1/*EGFR*, Her-2/*ERBB2*, Her-3/*ERBB3* e Her-4/*ERBB4* que podem ser expressos tanto em células de origem mesodérmica quanto ectodérmica (YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001).

A relação entre estes receptores e o câncer foi estabelecida quando se verificou que o gene *v-erbB* (homólogo do *EGFR*) codifica um receptor sem o domínio externo responsável pela ligação com o agonista, assim sua ação cinásica permanece constantemente ativada levando a desregulação do ciclo celular e gerando a eritroleucemia aviária (DOWNWARD et al., 1984). Assim os genes *ERBB* foram considerados então proto-oncogenes, que podem levar ao desenvolvimento de células neoplásicas por superexpressão ou amplificação gênica, sendo sua ativação em células neoplásicas responsável pelo estímulo a proliferação celular, invasão, neovascularização e metastatização, além de inibição da apoptose (CIARDIELLO; TORTORA, 2008).

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), codificado pelo gene *EGFR* que está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2) e é composto por 30 éxons, apresenta peso molecular de 170kDa e é formado por 1.186 aminoácidos (SRIVASTAVA et al., 2001) e possui grande importância no controle da proliferação celular e adesão (CARPENTER; COHEN, 1979; DOWNWARD et al., 1984). Em células normais a expressão de EGFR varia de 40.000 a 100.000 receptores por célula (CARPENTER; COHEN, 1979) e é abundante na maioria dos tumores sólidos, podendo chegar a mais de 2 milhões de cópias por célula neoplásica (HERBST; LANGER, 2002). A superexpressão deste receptor leva a intensa ativação de vias de sinalização promovendo exacerbado crescimento celular e características de malignidade, como invasão (ETHIER, 2002).

O gene *ERBB2*, localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q12), codifica o receptor de fator de crescimento epidérmico do tipo 2 ou Her-2 (SCHECHTER et al., 1984), que também participa da regulação da proliferação celular (MÉNARD et al., 2000). Em células normais existem cerca de 50.000 cópias da proteína expressas na membrana, já em células neoplásicas mamárias com amplificação ou superexpressão deste gene pode-se encontrar até 1 milhão de cópias, o que levou ao desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-Her-2, o transtuzumab (SLAMON et al., 1987), que levou a redução drástica dos índices de mortalidade e recidiva (PICCART-GEBHART et al., 2005).

O receptor de fator de crescimento epidérmico do tipo 3 ou Her-3, é codificado pelo gene *ERBB3* localizado no cromossomo 12q13.2, e é o único receptor da família considerado uma pseudocinase inativa, devido a alteração de aminoácidos no sítio responsável por desprotonação do substrato (PLOWMAN et al., 1990). Entretanto alguns trabalhos demonstram que este receptor quando agrupado na membrana é capaz de realizar auto-fosforilação, porém em um

nível 1000 vezes mais fraca que a realizada pelo EGFR (SHI et al., 2010) ou ainda formar complexos com o Her-2, garantindo alta afinidade ao ligante (SLIWKOWSKI et al., 1994). Ele também está envolvido com a progressão neoplásica de diversos tumores devido à sua relação com os estímulos para proliferação celular (MUJOO et al., 2014).

O receptor de fator de crescimento epidérmico do tipo 4 ou Her-4, é codificado pelo gene *ERBB4* localizado no cromossomo 2q34, possui 180kDa e apresenta domínio citoplasmático com semelhança de 79% e 77% com o domínio apresentado por EGFR e Her-2 respectivamente (PLOWMAN et al., 1993), e também já foi relacionado a proliferação e progressão neoplásica (NIELSEN et al., 2014).

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o cetuximab, um anticorpo monoclonal contra o domínio externo do EGFR, promove a supressão da formação de metástase de melanoma humano em camundongos imunodeficientes (NARAMURA et al., 1993) e redução da capacidade de invasão de uma linhagem imortalizada de células de melanoma (BOONE et al., 2011).

A superexpressão de EGFR, Her-3 e Her-4 é descrita em melanomas humanos e correlacionada a pior prognóstico (BOONE et al., 2011; PRICKETT et al., 2009; RESCHKE et al., 2008), já a amplificação e superexpressão de Her-2 geralmente não é encontrada em melanomas (KLUGER et al., 2004).

O aumento da expressão de EGFR em melanomas tem sido associado com a progressão da doença, reduzida sobrevida, maior tamanho tumoral, além de ser mais evidente nas metástases (BASTIAN et al., 1998; BOONE et al., 2011; RÁKOSY et al., 2007; UDART et al., 2001). Trabalhos sobre o papel destes receptores no melanoma em cães não foram encontrados na literatura.

## **2.6 - Relação entre receptores de fator de crescimento epidérmico e a transição epitélio-mesênquima**

Existem diversos mecanismos moleculares relacionados ao estímulo para a TEM, dentre eles a sinalização por TGF- $\beta$  (HAN et al., 2005), IGF-1R (KIM et al., 2007) e também por EGF, que pode em carcinomas mamários estimular as células neoplásicas a adquirirem um fenótipo mesenquimal além de promover redução da expressão de E-caderina e aumento da expressão

de vimentina e Twist (LO et al., 2007), sendo efeitos similares descritos também no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HOLZ et al., 2011).

A superexpressão do EGFR leva a ativação da via ERK1/2, via esta que induz a expressão dos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2, o que leva a inibição da expressão de E-caderina e pode desencadear a TEM (THOMAS et al., 2012).

Outros autores descreveram a colocalização do EGFR e da E-caderina em junções aderentes (CHEN et al., 2002), entretanto nestas situações o domínio extracelular da E-caderina parece impedir a ligação do EGF ao EGFR (QIAN et al., 2004) e o domínio citoplasmático suprime a via de sinalização desencadeada após a dimerização do receptor e consequente desencadeamento da atividade cinásica da porção citoplasmática do EGFR (PERRAIS et al., 2007), o que demonstra o potencial inibitório da E-caderina sobre os receptores de fator de crescimento epidérmico.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Em virtude da relevância de estudos para compreender o comportamento dos melanomas, que tanto em humanos e em cães é uma importante causa de morte por neoplasias, assim como o potencial uso dos melanomas caninos como modelos em oncologia comparada com humanos, o presente trabalho se justifica, pois os cães podem servir como modelo de estudo em oncogênese e oncologia comparada, auxiliando a uma melhor compreensão da biologia dos melanomas, direcionando o estabelecimento de fatores prognósticos relacionados a invasão tumoral, através da TEM. A escolha da expressão de EGFRs justifica-se por trabalhos com melanoma humano indicar sua relação com a TEM, assim como sua relação com características de invasão e progressão neoplásica no melanoma humano.

### **4. HIPÓTESE**

Nos melanomas caninos tem-se a superexpressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFRs), favorecendo o crescimento tumoral e a ocorrência da TEM, estimulando a invasão e aumento do potencial metastático tumoral.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 - Objetivo Geral

Verificar a expressão e relação entre moléculas relacionadas a transição epitélio-mesênquima e receptores de fator de crescimento epidérmico com em melanomas caninos orais e cutâneos.

### 5.2 - Objetivos Específicos

- Determinar a expressão imuno-histoquímica de EGFR, Her-2, Her-3, Her-4, E-caderina, N-caderina, dos fatores de transcrição Snail, ZEB1 e ZEB2 e de Ki-67 em melanomas caninos cutâneos e de cavidade oral.
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica de E-caderina, N-caderina, dos fatores de transcrição Snail, ZEB1 e ZEB2 com características histopatológicas dos melanomas caninos cutâneos e de cavidade oral.
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica de EGFR, Her-2, Her-3 e Her-4 com características histopatológicas dos melanomas caninos cutâneos e de cavidade oral.
- Verificar a presença de ampliações do gene *ERBB2* e sua relação com características histopatológicas dos melanomas caninos cutâneos e de cavidade oral.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 - 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 008/2016).

### 6.2 - Espécimes

Foram analisados 58 casos de melanoma obtidos de cães de diversas raças submetidos a exérese cirúrgica no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM) e no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) cuja amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências

Biológicas da UFMG para diagnóstico histopatológico. Foram utilizadas amostras recebidas entre os anos de 2005 e 2016.

### **6.3 - 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 ótica para classificação segundo os parâmetros da OMS (GOLDSCHMIDT et al., 1998). Na avaliação histopatológica foi determinado o escore de pigmentação das lesões (0: ausência de células neoplásicas pigmentadas; 1: 1-25% de células neoplásicas pigmentadas; 2: 26-50% de células neoplásicas pigmentadas e 3: >51% de células neoplásicas pigmentadas), e avaliado o índice mitótico, a presença de êmbolos, ulceração, desmoplasia e atividade juncional (lentiginosa ou pagetoide).

### **6.4 - Imuno-histoquímica**

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Advance<sup>TM</sup> HRP*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA ou *Novolink Polymer Detection Sistem*; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK ou *Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)*, Nicherei Fresh Inc., Chun, Tokyo, Japan). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido (banho-maria a 98°C) ou calor úmido pressurizado a 125°C (*Pascal® Pressure Cooker*; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) com *Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0* (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ou EDTA pH 9,0. Outro método de recuperação antigênica utilizado foi a recuperação enzimática com pepsina a 37°C por 30 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 10 minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum-Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 30 minutos (anti-Her-3), 1 hora (anti-ZEB1 e anti-ZEB2) ou 16 horas (anti-E-caderina, anti-N-caderina, anti-EGFR, anti-Her-2, anti-Her-4 anti-Ki67, anti-MelanA e anti-Melanom Antigen) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 1 minuto. Após

a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. Na Tabela 1 estão 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 1.** Anticorpos primários, fabricantes e padronização utilizadas no estudo imuno-histoquímico.

	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tempo de Incubação</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
<b>E-caderina</b>	Invitrogen	4A2C7	1:100	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>N-caderina</b>	Dako	6G11	1:50	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>ZEB1</b>	Sigma-Aldrich	Policlonal	1:200	1h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>ZEB2</b>	Sigma-Aldrich	Policlonal	1:100	1h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>Snail</b>	Abcam	Policlonal	1:100	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>EGFR</b>	Invitrogen	31G7	1:50	16h	Recuperação enzimática	HRP
<b>Her-2</b>	Dako	Policlonal	1:200	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>Her-3</b>	Genetex	Policlonal	1:100	30 minutos	EDTA + calor úmido	Histofine
<b>Her-4</b>	Santa Cruz	C18	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Histofine
<b>Ki-67</b>	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melan-A</b>	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melanoma Antigen</b>	Santa Cruz	PNL-2	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink

### 6.5 - 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 que 10% das células neoplásicas, para qualquer um dos marcadores (SMEDLEY et al., 2011).

Para determinar o índice proliferativo das lesões utilizamos a imuno-histoquímica com o anticorpo anti-Ki67, onde obtivemos o percentual de células neoplásicas com núcleo imunomarcado a partir da análise de 500 células, em campos histológicos de maior aumento (40X). Foram consideradas de alto índice proliferativo as lesões orais com percentual  $\geq 19,5$  e as cutâneas com percentual  $\geq 15$  (SMEDLEY et al., 2011).

A marcação membranar, citoplasmática e nuclear de N-caderina, além da 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 (50-75%), 4 (>75%). A marcação para os fatores de transcrição Snail, ZEB1 e ZEB2 foi determinada de acordo com o percentual de células neoplásicas marcadas. O *cut-off* para os anticorpos Snail, ZEB1 e ZEB2 foi determinado de acordo com a média de todos os casos + desvio padrão.

A expressão de EGFR e Her-2 foi avaliada na membrana de células neoplásicas e classificada segundo o escore 0: marcação membranar ausente ou incompleta muito fraca em menos de 10% das células; 1+: marcação membranar incompleta muito fraca em mais de 10% das células; 2+: marcação membranar incompleta fraca ou moderada em mais de 10% das células ou completa intensa em menos de 10% das células; 3+: marcação membranar completa intensa em mais de 10% das células (Adaptado do sistema de pontuação *Herceptest*® Dako). Avaliamos ainda a expressão citoplasmática de Her-2 classificando os casos segundo o percentual de células imunomarcadas: 0: ausência de marcação; 1+: marcação citoplasmática em menos que 10% das células neoplásicas; 2+: marcação citoplasmática em 10 a 30% das células neoplásicas; 3+: marcação citoplasmática em 30-60% das células neoplásicas e 4+: marcação citoplasmática em mais que 60% das células neoplásicas.

A expressão de Her-3 foi avaliada no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas separadamente e classificada segundo o escore 0: ausência de marcação; 1+: fraco; 2+: moderado; 3+ forte de acordo com a intensidade de marcação em pelo menos 30% das células (KIM et al., 2011) e determinamos ainda, de maneira semiquantitativa, o percentual de células neoplásicas marcadas.

A expressão de Her-4 foi avaliada no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas separadamente e classificada segundo o escore 0: ausência de marcação; 1+: fraco; 2+: moderado; 3+ forte de acordo com a intensidade de marcação em pelo menos 10% das células (HOLLMÉN et al., 2012).

## 6.6 - Hibridização *in situ* com Revelação Cromogênica (CISH)

Para avaliar o número de cópias do cromossomo 17 e gene *ERBB2* foi realizada a técnica de hibridização *in situ* com revelação cromogênica com o kit para detecção CISH SPOT-Light Chromogenic ISH (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA). Seções histológicas de 4µm das lesões selecionadas foram hidratadas e pré-tratadas de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. Em sequência, as lâminas foram incubadas com a sonda do gene Her-2 (SPOT-Light HER-2 Probe), no Hybridizer Dako por 5 minutos à temperatura de 90°C e 10 horas (*overnight*) à temperatura de 37°C. A sonda hibridizada foi detectada utilizando o sistema CISH Polymer Detection Kit II e os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Mayers por 10 segundos. Como controles positivos foram usadas amostras de mama humana previamente testada.

A análise e interpretação da hibridização foi realizada de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante junto ao protocolo do kit. Para a análise da hibridização foram contadas 30 células neoplásicas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Amostras que apresentaram de 1 a 4 cópias do gene em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas sem amplificação, aquelas com 5-10 cópias ou pequenos aglomerados em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas de baixa amplificação, já as que apresentaram mais de 10 cópias ou grandes aglomerados em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas de alta amplificação.

## 6.7 - Análise Estatística

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

## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados na forma de 2 artigos científicos que se encontram nas normas dos respectivos periódicos a que serão submetidos.

### **Artigo 1: Fatores transcricionais ZEB e Snail e sua relação com a transição epitélio-mesênquima em melanomas caninos**

Este trabalho será submetido ao *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, que possui Qualis CAPES B1 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 2.648.

### **Artigo 2: Relação entre os receptores de fator de crescimento epidérmico e características histológicas em melanomas caninos cutâneos e orais**

Este trabalho será submetido ao *Veterinary And Comparative Oncology*, que possui Qualis CAPES B1 na área de avaliação Medicina II e fator de impacto de 1.819.

## 7.1) ARTIGO 1

### **Fatores transcricionais ZEB e Snail e sua relação com a transição epitélio-mesênquima em melanomas caninos**

Emerson S. Veloso, Ivy N. N. Gonçalves, Tatiany L. Silveira, Juliane T. E. Santo, Larissa V. Figueiredo, Mary S. Varaschin, Geovanni D. Cassali, Helen L. Del Puerto, Enio Ferreira

#### **Afiliação:**

(ESV, INNG, TLS, JTES, LVF, GDC, HLDP, EF) Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

(MSV) Setor de Patologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras

#### **Autor Correspondente:**

Enio Ferreira

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

E-mail: enioferreira@ufmg.br

#### ***Short Title***

A expressão de N-caderina em melanomas caninos evidencia a ocorrência de TEM

**Resumo**

O melanoma é uma neoplasia extremamente agressiva tanto em humanos quanto em cães e um dos fatores provavelmente envolvidos na sua progressão, em humanos, é a transição epitélio-mesênquima (TEM), que reconhecidamente participa da progressão de diversos tumores sólidos e tem como principal característica a perda de expressão de E-caderina e ganho de N-caderina. Em melanomas humanos alguns trabalhos já demonstram a participação deste evento na progressão da doença e pela primeira vez descrevemos, em melanomas caninos, resultados similares. Aproximadamente metade dos casos estudados perderam a expressão de E-caderina enquanto que quase a totalidade apresentava a expressão de N-caderina, interessante localizada principalmente no citoplasma e núcleo das células neoplásicas. A expressão de N-caderina citoplasmática e nuclear foi associada com a expressão do fator de transcrição ZEB1 enquanto que a expressão de N-caderina membranar associou-se com a expressão de ZEB2, já a associação entre o fator de transcrição Snail e a N-caderina parece ser alterada pela localização, oral ou cutânea, da lesão diferentemente do observado para os outros fatores estudados. Assim nosso trabalho evidencia a ocorrência da TEM em melanomas caninos e ainda a translocação da proteína membranar N-caderina para citoplasma e núcleo, sendo este evento aparentemente regulado pelos fatores de transcrição ZEB.

**Palavras-chave:** transição epitélio-mesênquima, melanoma, caderinas, cão



## **Introdução:**

A homeostase dos melanócitos é regulada pelos queratinócitos através da produção de fatores de crescimento e pela interação intercelular via moléculas de adesão(1). A perda desta interação permite a proliferação desordenada e invasão a tecidos subjacentes pelos melanócitos evento característico da progressão neoplásica (2).

O melanoma é considerado a neoplasia cutânea mais agressiva devido sua alta capacidade de invasão e reduzida sobrevida tanto em humanos(3) quanto em cães(4). Melanócitos neoplásicos apresentam reduzida interação com os queratinócitos, o que permite a adesão a fibroblastos e células endoteliais, evento caracterizado como transição epitélio-mesênquima (TEM)(5,6).

Na TEM, total ou parcial, as células perdem características tidas como epiteliais e adquirem fenótipo mesenquimal, facilitando assim a migração, invasão e resistência a apoptose(7). A TEM é bem documentada em melanócitos durante a embriogênese, quando estas células migram da crista neural, através do mesênquima, para se alocarem na camada basal da epiderme(8). Assim, mesmo o melanócito tendo origem na crista neural(9), a TEM é tida como um dos eventos relacionados a progressão dos melanomas(10,11).

Dentre os eventos presentes na TEM e desenvolvimento neoplásico tem-se a “cadherin switch” caracterizada pela alteração das moléculas de adesão, redução da expressão de E-caderina e ganho de N-caderina(6), sendo que o perfil de caderinas parece determinar a localização do melanócito na pele(12).

A E-caderina, uma glicoproteína transmembranar, é encontrada principalmente em tecidos epiteliais onde promove junções de aderência entre as células que a expressam(13), já a N-caderina é encontrada em fibroblastos e células neurais e promove adesões celulares menos estáveis(14). A expressão de E-caderina pode ser regulada negativamente, em células epiteliais e melanócitos, através dos fatores de transcrição da família *Zinc Finger E-box-binding homeobox* (ZEB) (15,16) e em linhagens celulares de melanomas esta redução não está envolvida com mutações e sim com silenciamento gênico via o repressor transcricional Snail(17,18). O ganho de N-caderina, além de facilitar a adesão a outros melanócitos, fibroblastos e células endoteliais, promove também a ativação da via anti-apoptótica Akt/PKB e inativação da via pró-apoptótica associada a BCL-2(19).

Ensaio *in vitro* com linhagens celulares de melanoma demonstraram que a redução da expressão de E-caderina e/ou o ganho de N-caderina facilitam a invasão celular promovendo a

formação de metástases(19,20). A reduzida expressão de E-caderina em melanomas cutâneos humanos foi considerada um marcador de pior prognóstico quando avaliada isoladamente(21), e também quando avaliada em conjunto com a alta expressão de N-caderina(5). Em melanomas orais caninos recentemente foi descrita uma reduzida expressão de E-caderina em relação a mucosa normal(22). Han et al., 2012 avaliaram melanomas caninos e observaram a expressão de E-caderina preservada em apenas 17% dos casos de melanoma orais e 28% dos casos cutâneos estudados(23).

Frente a alta agressividade dos melanomas em cães e a escassez de informações sobre os eventos de transição epitélio-mesênquima nesse tipo tumoral o presente trabalho teve por objetivo determinar a expressão de E-caderina, N-caderina, Snail, ZEB1 e ZEB2 e sua relação com marcadores prognósticos e características morfológicas em melanomas caninos cutâneos e orais.

## **Materiais e Métodos:**

### *Aspectos éticos*

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 008/2016).

### *Espécimes*

Foram analisados 58 casos de melanoma obtidos de cães de diversas raças submetidos a exérese cirúrgica no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFGM) e no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) cuja amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da UFGM para diagnóstico histopatológico. Foram utilizadas amostras recebidas entre os anos de 2005 e 2016.

### *Avaliação Histopatológica*

Após 24 horas de fixação em formol neutro e tamponado a 10% os espécimes foram avaliados macroscopicamente, clivados e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, a partir do qual foram obtidas secções histológicas de 4µm, coradas então pela técnica da hematoxilina-eosina para análise em microscopia óptica e classificação histológica de acordo com a Organização Mundial de Saúde(24).

Os melanomas foram classificados qualitativamente quanto a sua pigmentação em escore 0 a 3 quanto a ausência de células neoplásicas pigmentadas (0); 1-25% de células neoplásicas pigmentadas (1); 26-50% de células neoplásicas pigmentadas (2);  $\geq 51\%$  de células neoplásicas pigmentadas (3). Os casos que apresentaram pigmentação 3 não foram incluídos neste estudo devido a dificuldade de visualização da marcação imuno-histoquímica citoplasmática. Dos casos analisados aqueles com escore 0 foram considerados amelanóticos enquanto os que apresentaram escore 1 e 2 foram considerados melanóticos. Avaliou-se ainda o índice mitótico e a presença de êmbolos, ulceração, desmoplasia e atividade juncional (lentiginosa ou pagetoide).

### *Imuno-histoquímica*

O procedimento imuno-histoquímico foi realizado pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (Advance<sup>TM</sup> HRP; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA ou Novolink Polymer Detection Sistem; Leica

Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido (banho-maria a 98°C) ou calor úmido pressurizado a 125°C (Pascal® Pressure Cooker; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) com Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark). Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 10 minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em Protein Block Serum-Free Ready to Use (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 1 hora (anti-ZEB1 e anti-ZEB2) ou 16 horas (anti-E-caderina, anti-N-caderina, anti-Snail, anti-Ki67, anti-MelanA e anti-Melanom Antigen) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 1 minuto. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. Na Tabela 1 estão listados fabricantes, clones, diluição e tempo de incubação de cada anticorpo utilizado. Para controle negativo foi omitida a etapa de incubação do anticorpo primário, com sua substituição pelo diluente de anticorpo (Antibody Diluent with Background Reducing Components; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA).

#### *Interpretação da imuno-histoquímica*

Todas as análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em aumento de 40x (Olympus – BX41). Os anticorpos anti-Melan-A e anti-Melanoma Antigen foram utilizados para comprovar o diagnóstico de melanoma nas amostras estudadas. Realizou-se a 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 que 10% das células neoplásicas(25).

A marcação membranar, citoplasmática e nuclear de N-caderina, além da membranar de E-caderina foram avaliadas nas células neoplásicas e classificadas segundo o percentual de células marcadas: 0 (ausência de marcação), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (>75%). A marcação para fatores de transcrição Snail, ZEB1 e ZEB2 foi determinada de acordo com o percentual de células neoplásicas marcadas. O *cut-off* para os anticorpos Snail, ZEB1 e ZEB2 foi determinado

de acordo com a média do percentual de células marcadas para cada anticorpo acrescido de 1 desvio padrão.

O anticorpo anti-Ki-67 foi utilizado para determinar o índice proliferativo das lesões, a partir da obtenção do percentual de células neoplásicas com marcação nuclear em 500 células contadas. Foram considerados de alto índice proliferativo os casos orais com índice  $\geq 19.5\%$  e os cutâneos com índice  $\geq 15\%$  (25).

#### *Análise estatística*

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

## Resultados

### *Parâmetros Clinicopatológicos*

Dos 58 casos analisados 66% (38/58) eram cutâneos e 34% (20/58) orais. A maior parte dos tumores cutâneos (84%, 32/38) eram melanóticos ( $p= 0,01238$ ) e não apresentavam atividade juncional (73%, 27/37) ( $p= 0,05$ ), eventos não observados com significância estatística nos tumores orais, que apresentavam apenas maior frequência de ulceração (80%, 16/20) ( $p= 0,01$ ). A frequência das demais características histológicas por localização tumoral são listadas na Tabela 2.

Os melanomas cutâneos fusiformes apresentaram maior frequência de desmoplasia em relação aos cutâneos epitelióides ( $p= 0,0008$ ) e menor frequência de ulceração ( $p= 0,0302$ ). A pigmentação e presença de atividade juncional apresentaram-se associadas nos melanomas cutâneos ( $p= 0,0197$ ), sendo 85% dos tumores amelanóticos negativos para atividade juncional enquanto que 60% dos melanóticos apresentam envolvimento epitelial.

### *Expressão imuno-histoquímica de E-caderina e N-caderina*

A expressão de E-caderina (Figura 1a e 1b) foi observada em 45% (9/20) dos casos orais e 58% (22/38) dos casos cutâneos (Figura 2a). Dos casos orais 55% (11/20), 20% (4/20), 10% (2/20) e 15% (3/20) apresentaram escore 0, 1, 2 e 3 respectivamente, e o escore 4 não foi observado, já nas lesões cutâneas 42% (16/38), 29% (11/38), 5% (2/38), 11% (4/38) e 13% (5/38) apresentaram escore 0, 1, 2, 3 e 4 respectivamente (Figura 2b).

Ao avaliarmos a N-caderina quanto a presença/ausência independentemente da sua localização (nuclear, citoplasmática ou membranar) observamos que 95% (18/19) dos casos orais e 92% (34/37) dos casos cutâneos apresentam expressão em ao menos uma sublocalização celular (Figura 3a). Dos casos orais 16% (3/19), 42% (8/19), 5% (1/19), 11% (2/19) e 21% (4/19) apresentam expressão somente nuclear, somente citoplasmática, somente membranar (Figura 1c), em núcleo e citoplasma e em citoplasma e membranar respectivamente (Figura 3b). Já nos casos cutâneos 19% (7/37), 40% (15/37), 3% (1/37), 22% (8/37) e 8% (3/37) apresentam expressão somente nuclear (Figura 1d), somente citoplasmática, somente membranar, em núcleo e citoplasma e em citoplasma e membranar respectivamente (Figura 3c). A expressão concomitante em núcleo e membrana e ainda nas 3 sublocalizações celulares não foi observada.

### *Expressão imuno-histoquímica dos fatores de transcrição ZEB1, ZEB2 e Snail*

Após interpretação da imuno-histoquímica para os fatores de transcrição obtivemos o percentual de células positivas para cada marcador e a partir disso determinamos os *cut-offs* apresentados na Tabela 3.

A alta expressão nuclear de Snail (Figura 4a) foi observada em 11% dos casos orais e 13% dos casos cutâneos (Figura 5a). Para ZEB1 nuclear (Figura 4b) em 21% dos orais e 19% dos cutâneos (Figura 5b). ZEB2 nuclear (Figura 4c) foi observado em mais de 37% das células neoplásicas em 19% dos casos orais e apenas 8% dos cutâneos (Figura 5c), e a expressão citoplasmática de ZEB2 foi maior que o *cut-off* determinado em apenas 6% tanto dos casos orais quanto cutâneos (Figura 5d).

O percentual médio de expressão de Snail nuclear foi de 11% para os casos orais e 9% para os casos cutâneos (Figura 6a) ( $p = 0,2848$ ), enquanto que a expressão citoplasmática não foi observada assim como a de ZEB1. Já para a expressão nuclear de ZEB1 obtivemos uma média de 27% para os casos orais e 24% para os casos cutâneos (Figura 6b) ( $p=0,8031$ ). A expressão citoplasmática de ZEB2 foi encontrada, em média, em 21% das células neoplásicas dos casos orais e 11% para os casos cutâneos (Figura 6c) ( $p = 0,2983$ ). Por fim, a expressão nuclear de ZEB2 foi observada, em média, em apenas 2% das células neoplásicas dos casos orais e 3% para os casos cutâneos (Figura 6d) ( $p = 0,8301$ ).

### *Relação entre a expressão de N-caderina e os fatores de transcrição ZEB1, ZEB2 e Snail*

A relação entre Snail e a expressão de N-caderina é dependente da localização da lesão e da sub-localização de N-caderina. Nos melanomas cutâneos o aumento da expressão de N-caderina nuclear está relacionada a redução da expressão de Snail ( $r = -0,3777$ ;  $p = 0,0232$ ). Diferentemente, em melanomas orais o aumento da expressão de Snail possui relação com o aumento de N-caderina nuclear ( $r = 0,5052$ ;  $p = 0,0325$ ) e redução da expressão membranar de N-caderina ( $r = -0,4930$ ;  $p = 0,0376$ ).

A elevação da expressão de ZEB1 está relacionada ao aumento da expressão tanto de N-caderina nuclear ( $r = 0,4051$ ;  $p = 0,0143$ ) quanto citoplasmática ( $r = 0,3898$ ;  $p = 0,0188$ ) assim como a expressão citoplasmática de ZEB2 e N-caderina membranar ( $r = 0,3092$ ;  $p = 0,0289$ ). A expressão citoplasmática de ZEB2 apresentou ainda correlação com a presença de êmbolos ( $r = 0,2830$ ;  $p = 0,0464$ ).

*Proliferação celular e sua relação com parâmetros clinicopatológicos e marcadores de TEM*

O índice proliferativo médio das lesões orais foi de 32% e das cutâneas de 22% (Gráfico 7a) ( $p= 0,5373$ ). O índice mitótico médio foi de 4.71 para os melanomas orais e 3.56 para os cutâneos (Gráfico 7b) ( $p= 0,1692$ ). Dos casos orais 77% foram considerados de alto índice proliferativo assim como 59% dos cutâneos. Observamos alto índice mitótico em 71% dos casos orais e 44% dos casos cutâneos. O índice proliferativo, na análise de todos melanomas (orais e cutâneos), apresentou correlação positiva com a presença de êmbolos ( $r= 0,3453$ ;  $p= 0,0422$ ) e negativa com a pigmentação ( $r= -0,3692$ ;  $p= 0,0267$ ). Nos melanomas orais, observamos correlação entre o índice proliferativo e o diagnóstico epitelióide ( $r= 0,5698$ ;  $p= 0,0421$ ), e nas lesões cutâneas correlação negativa entre o índice proliferativo e a presença de desmoplasia ( $r= -0,4232$ ;  $p= 0,0442$ ). O índice mitótico não apresentou associação e/ou correlação com nenhum dos parâmetros avaliados.

O índice proliferativo apresentou, independentemente da localização, correlação negativa com a expressão de N-caderina citoplasmática ( $r= -0,3506$ ;  $p= 0,0421$ ). Considerando apenas as lesões cutâneas observamos correlações negativas com a expressão de ZEB1 ( $r= -0,6100$ ;  $p= 0,0020$ ) e nuclear de N-caderina ( $r= -0,5072$ ;  $p= 0,0160$ ). Nos melanomas orais a proliferação apresentou correlação positiva com a expressão de Snail ( $r= 0,5962$ ;  $p= 0,0315$ ). A presença de N-caderina, independentemente da localização celular, apresentou correlação negativa com o índice proliferativo ( $r= -0,4657$ ;  $p= 0,0063$ ).



## Discussão

O melanoma canino, assim como em humanos, frequentemente tem pouca resposta aos quimioterápicos convencionais(26), reduzida sobrevida e elevados índices de metástases, especialmente para as lesões orais (4). Diversos trabalhos têm associado, em linhagens celulares e melanomas humanos, a TEM com a progressão destes tumores(11,19,20,27).

Os melanomas caninos orais são clinicamente mais agressivos e de pior prognóstico(28,29), o que incentiva a busca por marcadores que o diferenciem das lesões cutâneas. Ao contrário do que esperávamos a expressão das caderinas não parece variar entre as lesões orais e cutâneas.

Nossos dados demonstram que aproximadamente metade dos casos estudados não apresentam a expressão de E-caderina e a maioria possuem expressão de N-caderina. Visto que o perfil de expressão de caderinas em melanócitos normais é prevalência da presença de E-caderina sobre a de N-caderina(30) temos uma evidência de alterações transcricionais compatíveis com o perfil de TEM, similar ao demonstrado em outras neoplasias veterinárias(31,32) e humanas(33,34). Na literatura não são encontrados trabalhos a respeito do perfil de expressão de N-caderina em melanomas caninos, entretanto ensaios *in vitro* com linhagens de carcinomas mamários caninos metastáticos demonstraram que a inibição da TEM leva a redução da expressão de N-caderina e da capacidade invasiva(35). Ensaios realizados com linhagens celulares de melanoma humano demonstraram que o “*knockdown*” da expressão de N-caderina reduz significativamente a capacidade invasiva das células neoplásicas(36). A expressão de N-caderina em melanomas é então associada a um pior prognóstico e a sua expressão ocorre também nos melanomas caninos, onde pode desempenhar o mesmo papel.

Evidenciamos a prevalência da expressão citoplasmática de N-caderina e poucos casos com expressão membranar. A N-caderina no citoplasma já havia sido reportada para carcinomas de esôfago(37), nasofaríngeo(38) e de células escamosas oral(39). Em melanomas humanos a expressão citoplasmática é aumentada quando comparada aos nevos e tende a estar associada à reduzida sobrevida, já a expressão membranar é mais frequente nos nevos e intensa nas metástases(40). O comportamento desta proteína demonstra ser similar entre melanomas caninos e humanos e a sua endocitose não impede a migração celular. Trabalhos avaliando as vias de endocitose de N-caderina nas neoplasias não são encontrados na literatura para esclarecimento deste evento.

Observamos ainda a expressão nuclear de N-caderina em parte dos nossos casos. A expressão nuclear, em carcinomas nasofaríngeos, demonstrou-se um marcador independente de pior prognóstico(38). Poucos trabalhos avaliaram a presença de N-caderina no núcleo, mas sua expressão foi visualizada também durante a transição endotélio-mesequimal(41) e considerada necessária para a TEM em carcinomas mamários(42).

A expressão de N-caderina, em nossos casos, apresenta correlação inversa com o índice proliferativo. Com a TEM tem-se alterações nas vias ligadas ao estímulo para proliferação celular(43), assim devido ao papel migratório/invasor da expressão de N-caderina e sua participação na TEM, acreditamos que durante a evolução da TEM as células reduzem sua capacidade proliferativa devido as adaptações genóticas e fenotípicas a que estão expostas. Outra possível explicação para a correlação inversa entre a expressão de N-caderina e o índice proliferativo é que a TEM é reconhecida por estimular a diferenciação para um fenótipo similar ao de *cancer stem cells*, onde as células apresentam reuzido índice proliferativo, porém elevada resistência a quimioterápicos e alta poder metastático (44).

A TEM é regulada por diversos fatores de transcrição, dentre eles Snail e ZEB que regulam negativamente a expressão de E-caderina(45–47), entretanto não observamos associações entre a expressão destes fatores e a presença de E-caderina, mas sim com a N-caderina. Pouco se conhece sobre as vias diretamente envolvidas no estímulo a expressão de N-caderina(6), os únicos fatores de transcrição sabidamente envolvidos tanto na repressão da E-caderina quanto estímulo a N-caderina são o Twist(48,49) e o ZEB2(50).

Em nossos casos ZEB1 está associado com a expressão de N-caderina no núcleo e citoplasma das células neoplásicas, enquanto que ZEB2 está associado com a presença de N-caderina na membrana destas células. Tanto a expressão de ZEB1 quanto ZEB2 participam do estímulo a TEM em melanomas(16,51) mas apenas ZEB2 já havia sido relacionado ao aumento de N-caderina, porém em carcinomas intestinais(50). Devido a correlação entre ZEB1 e ZEB2 com diferentes localizações celulares de N-caderina estes fatores de transcrição provavelmente estão envolvidos na translocação e/ou endocitose da proteína.

A relação entre Snail/N-caderina não foi previamente abordada na literatura e nossos dados indicam que mesmo os melanomas orais e cutâneos tendo mesmo padrão de expressão das caderinas à regulação de N-caderina via Snail difere entre os sítios tumorais.

Em síntese, evidenciamos a ocorrência de TEM em melanomas caninos bem como a translocação da proteína N-caderina para núcleo e citoplasma, que parecem, segundo a literatura, estarem associadas a pior prognóstico. Além disso a regulação deste evento no modelo canino, assim como em humanos, está relacionada aos fatores de transcrição ZEB e Snail.

### **Agradecimentos**

Os autores gostariam de agradecer a equipe do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte prestado e aos tutores dos animais envolvidos neste estudo.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesse em relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

### **Contribuição dos Autores**

ESV projetou o trabalho, realizou a seleção de casos, avaliações histopatológicas, imunohistoquímicas, analisou os dados e escreveu o artigo. INNG, TLS, JTES e LVF auxiliaram na seleção de casos e procedimentos técnicos. MSV e GDC auxiliaram na seleção dos casos. HLDP auxiliou na projeção do trabalho, análise de dados e escrita do artigo. EF projetou o trabalho, realizou a seleção de casos e avaliações histopatológicas, analisou os dados e escreveu o artigo. Todos os autores leram e aprovaram a versão final deste manuscrito.

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações do Governo Brasileiro.

## Referências

1. Haass NK, Herlyn M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. *J Investig Dermatology Symp Proc* [Internet]. 2005 Nov;10(2):153–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1087-0024.2005.200407.x>
2. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, et al. SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Aug 1;66(15):7516–23. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-3189>
3. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(1):51–65.
4. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter V k. Clinical and Histopatological Diagnosis. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat*. 2005. p. 406–10.
5. Kreizenbeck GM, Berger AJ, Subtil A, Rimm DL, Gould Rothberg BE. Prognostic Significance of Cadherin-Based Adhesion Molecules in Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2008 Apr 1;17(4):949–58. Available from: <http://www.omicsonline.org/2155-9929/2155-9929-3-129.digital/2155-9929-3-129.html>
6. 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>
7. Kalluri R, Weinberg R a. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Jun 1;119(6):1420–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487818>
8. Tucker RP. Neural crest cells: a model for invasive behavior. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2004 Feb;36(2):173–7. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=14643882&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/B8A54CBD-CBBD-462B-8038-92422BDC61D6>
9. Thomas AJ, Erickson CA. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. 2008 Dec;21(6):598–610. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x>
10. Kregel S, Groteluschen F, Bartsch S, Tronnier M. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. *J Cutan Pathol* [Internet]. 2004 Jan;31(1):1–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0303-6987.2004.0106.x>
11. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, et al. A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Apr 1;67(7):3450–60. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-06-3481>

12. Nishimura EK, Yoshida H, Kunisada T, Nishikawa S-I. Regulation of E- and P-Cadherin Expression Correlated with Melanocyte Migration and Diversification. *Dev Biol* [Internet]. 1999 Nov;215(2):155–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545227>
13. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* (80- ) [Internet]. 1991 Mar 22;251(5000):1451–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2006419>
14. Bixby JL, Zhang R. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* [Internet]. 1990 Apr 1;110(4):1253–60. Available from: <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.110.4.1253>
15. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, et al. The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Mol Cell* [Internet]. 2001 Jun;7(6):1267–78. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727650100260X>
16. Denecker G, Vandamme N, Akay Ö, Koludrovic D, Taminau J, Lemeire K, et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014 Aug 25;21(8):1250–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769727>
17. Poser I, Domínguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin Expression in Melanoma Cells Involves Up-regulation of the Transcriptional Repressor Snail. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Jul 6;276(27):24661–6. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M011224200>
18. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Jan 1;24(1):306–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673164>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC303344/pdf/0802.pdf>
19. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* [Internet]. 2001;61(9):3819–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325858>
20. Hsu M-Y, Meier FE, Nesbit M, Hsu J-Y, Van Belle P, Elder DE, et al. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. *Am J Pathol* [Internet]. 2000 May;156(5):1515–25. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65023-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65023-7)
21. Tucci MG, Lucarini G, Brancorsini D, Zizzi A, Pagnaloni A, Giacchetti A, et al. Involvement of E-cadherin,  $\beta$ -catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* [Internet]. 2007 Dec;157(6):1212–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.2007.08246.x>
22. Pisamai S, Rungsipipat A, Kalpravidh C, Suriyaphol G. Gene expression profiles of cell adhesion molecules, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in canine oral tumors. *Res Vet Sci* [Internet]. 2017 Aug;113:94–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.09.009>

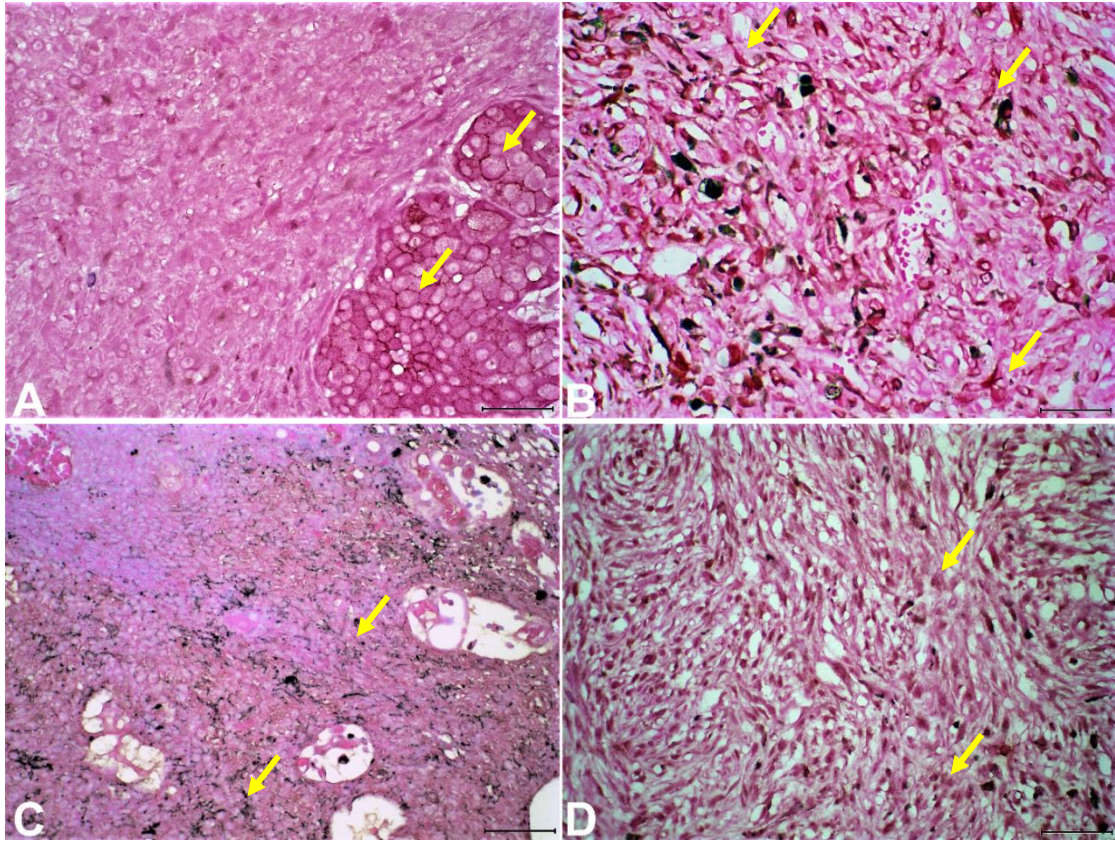
23. Han J-I, Kim Y, Kim D-Y, Na K-J. Alteration in E-Cadherin/B-Catenin Expression in Canine Melanotic Tumors. *Vet Pathol*. 2012;50(2):274–80.
24. Goldschmidt MH, Dustan RW, Stannard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals. 1998. p. 38–41.
25. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ, Ho H-Y, et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. *Vet Pathol* [Internet]. 2011 Jan 25;48(1):54–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266721>
26. Brockley L, Cooper M, Bennett P. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N Z Vet J* [Internet]. 2013 Jan;61(1):25–31. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.2012.699433>
27. Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G, Ferrao PT. Phenotype Switching in Melanoma: Implications for Progression and Therapy. *Front Oncol* [Internet]. 2015 Feb 13;5:1–7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00031/abstract>
28. Spangler WL, Kass PH. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol*. 2006;43(2):136–49.
29. Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, Webster JD, Prasad ML, Conway CM, et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* [Internet]. 2014 Jan;27(1):37–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pcmr.12185>
30. Fang D, Herlyn M. The dynamic roles of cell-surface receptors in melanoma development. In: Hearing VJ, Leong SPL, editors. *From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.; 2006. p. 169–81.
31. Gamba CO, Rodrigues MA, Gomes DA, Estrela-Lima A, Ferreira E, Cassali GD. The Relationship Between E-Cadherin and its Transcriptional Repressors in Spontaneously Arising Canine Invasive Micropapillary Mammary Carcinoma. *J Comp Pathol* [Internet]. 2015 Nov;153(4):256–65. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997515001310>
32. Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera-Calderón LG, Laufer-Amorim R. Evidence of epithelial–mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis. *Res Vet Sci* [Internet]. 2015 Jun;100:176–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.001>
33. Choi Y, Lee HJ, Jang MH, Gwak JM, Lee KS, Kim EJ, et al. Epithelial-mesenchymal transition increases during the progression of in situ to invasive basal-like breast cancer. *Hum Pathol* [Internet]. 2013;44(11):2581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2013.07.003>
34. Gonçalves N do N, Colombo J, Lopes JR, Gelaleti GB, Moschetta MG, Sonehara NM, et al. Effect of melatonin in epithelial mesenchymal transition markers and invasive properties of breast cancer stem cells of canine and human cell lines. *PLoS One*

- [Internet]. 2016;11(3):1–16. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0150407>
35. Leonel C, Borin TF, de Carvalho Ferreira L, Moschetta MG, Bajgelman MC, Vilorio-Petit AM, et al. Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis by Combined TGFbeta Knockdown and Metformin Treatment in a Canine Mammary Cancer Xenograft Model. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* [Internet]. 2017 Mar 11;22(1):27–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10911-016-9370-7>
  36. Qi J, Chen N, Wang J, Siu C-H. Transendothelial Migration of Melanoma Cells Involves N-Cadherin-mediated Adhesion and Activation of the -Catenin Signaling Pathway. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2005 Jun 15;16(9):4386–97. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E05-03-0186>
  37. Yoshinaga K, Inoue H, Utsunomiya T, Sonoda H, Masuda T, Mimori K, et al. N-cadherin is regulated by activin A and associated with tumor aggressiveness in esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(17):5702–7.
  38. Luo W-R, Wu A-B, Fang W-Y, Li S-Y, Yao K-T. Nuclear expression of N-cadherin correlates with poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2012 Aug;61(2):237–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2012.04212.x>
  39. DI Domenico M, Pierantoni GM, Feola A, Esposito F, Laino L, DE Rosa A, et al. Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* [Internet]. 2011 Dec;31(12):4211–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210408009487>
  40. Bachmann IM, Straume O, Puntervoll HE, Kalvenes MB, Akslen LA. Importance of P-Cadherin, -Catenin, and Wnt5a/Frizzled for Progression of Melanocytic Tumors and Prognosis in Cutaneous Melanoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 15;11(24):8606–14. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-0011>
  41. Ma J, Liu T, Dong X. Advanced glycation end products of bovine serum albumin-induced endothelial-to-mesenchymal transition in cultured human and monkey endothelial cells via protein kinase B signaling cascades. *Mol Vis* [Internet]. 2010 Dec 9;16:2669–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21179235>
  42. Maeda M, Johnson KR, Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Mar 1;118(5):873–87. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01634>
  43. Salt MB, Bandyopadhyay S, McCormick F. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Rewires the Molecular Path to PI3K-Dependent Proliferation. *Cancer Discov* [Internet]. 2014 Feb 1;4(2):186–99. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-13-0520>
  44. Zhao F, He X, Wang Y, Shi F, Wu D, Pan M, et al. Decrease of ZEB1 expression inhibits the B16F10 cancer stem-like properties. *Biosci Trends* [Internet]. 2015;9(5):325–34. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bst/9/5/9\\_2015.01106/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bst/9/5/9_2015.01106/_article)

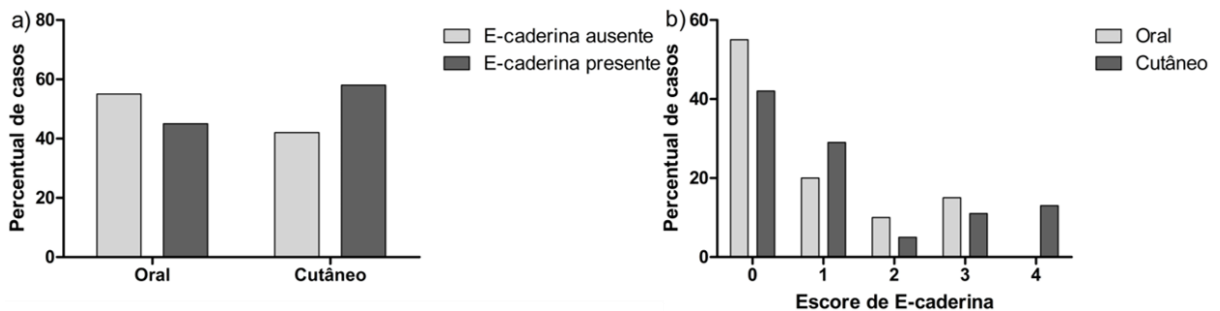
45. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2000 Feb 1;2(2):76–83. Available from: [http://www.nature.com/articles/ncb0200\\_76](http://www.nature.com/articles/ncb0200_76)
46. Drasin DJ, Robin TP, Ford HL. Breast cancer epithelial-to-mesenchymal transition: examining the functional consequences of plasticity. *Breast Cancer Res*. 2011;13(6):226.
47. Peng Z, Wang CX, Fang EH, Wang G Bin, Tong Q. Role of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer initiation and progression. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5403–10.
48. Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, Summers CE, Glackin C, Heimark RL. N-cadherin Gene Expression in Prostate Carcinoma Is Modulated by Integrin-Dependent Nuclear Translocation of Twist1. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Apr 1;66(7):3365–9. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-3401>
49. Kuphal S, Bosserhoff AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma. *Oncogene* [Internet]. 2006 Jan 29;25(2):248–59. Available from: <http://www.nature.com/articles/1209054>
50. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(20):6566–78.
51. Asnaghi L, Gezgin G, Tripathy A, Handa JT, Merbs SL, van der Velden PA, et al. EMT-associated factors promote invasive properties of uveal melanoma cells. *Mol Vis* [Internet]. 2015;21:919–29. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4548792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



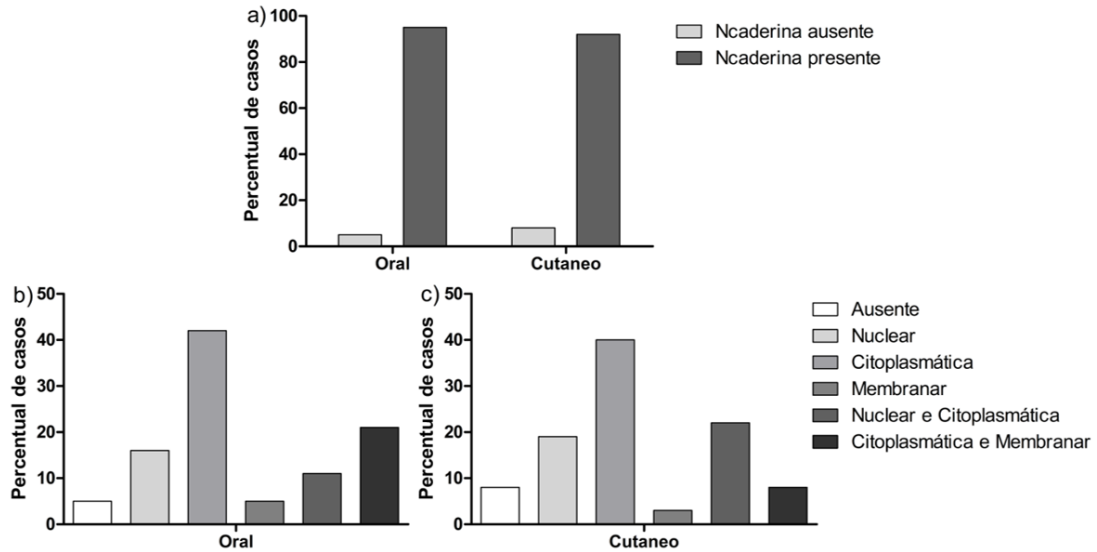
## Figuras e legendas



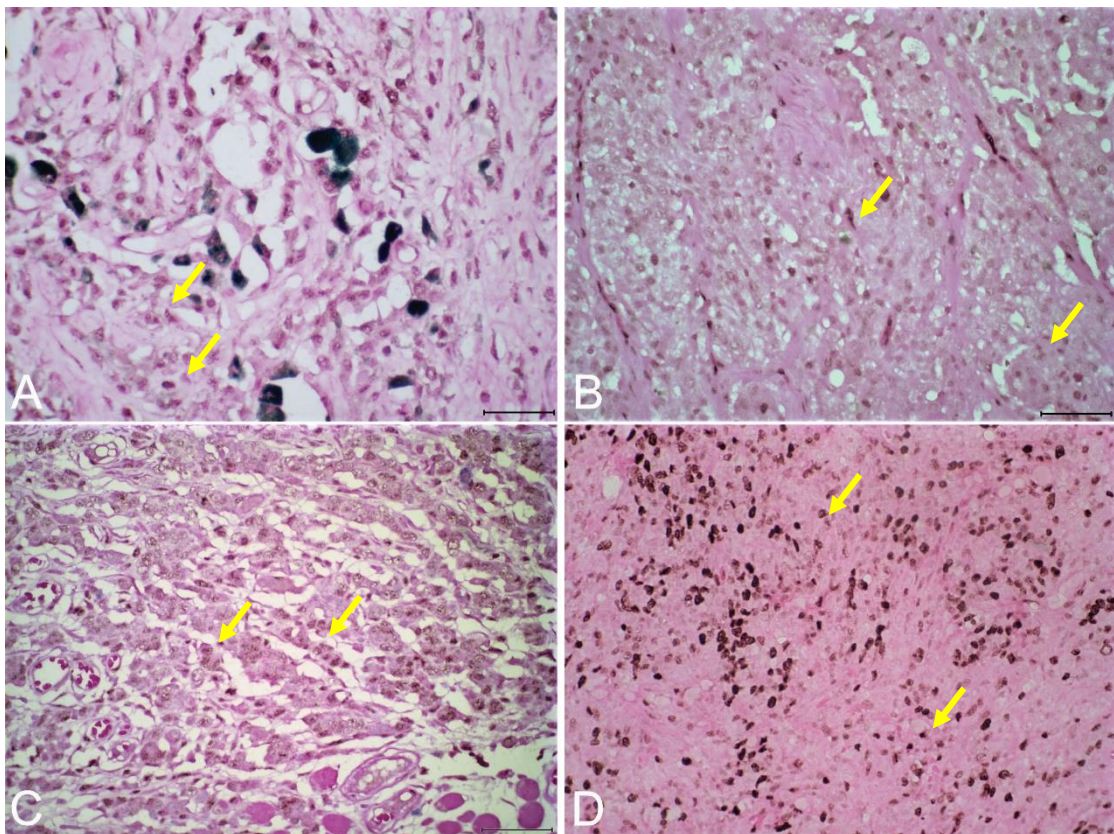
**Figura 1) Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão.** **A)** Melanoma cutâneo com imunomarcção membranar moderada para E-caderina. **B)** Melanoma cutâneo com imunomarcção membranar forte para E-caderina em 25 a 50% das células neoplásicas. **C)** Melanoma oral com imunomarcção membranar moderada para N-caderina em 50-75% das células neoplásicas. **D)** Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear forte para N-caderina em mais que 75% das células neoplásicas. Barra 50µm.



**Figura 2) Expressão imuno-histoquímica de E-caderina.** **A)** Distribuição percentual segundo ausência/presença de E-caderina em melanomas orais e cutâneos. **B)** Distribuição percentual por escore da expressão de E-caderina em melanomas orais e cutâneos.

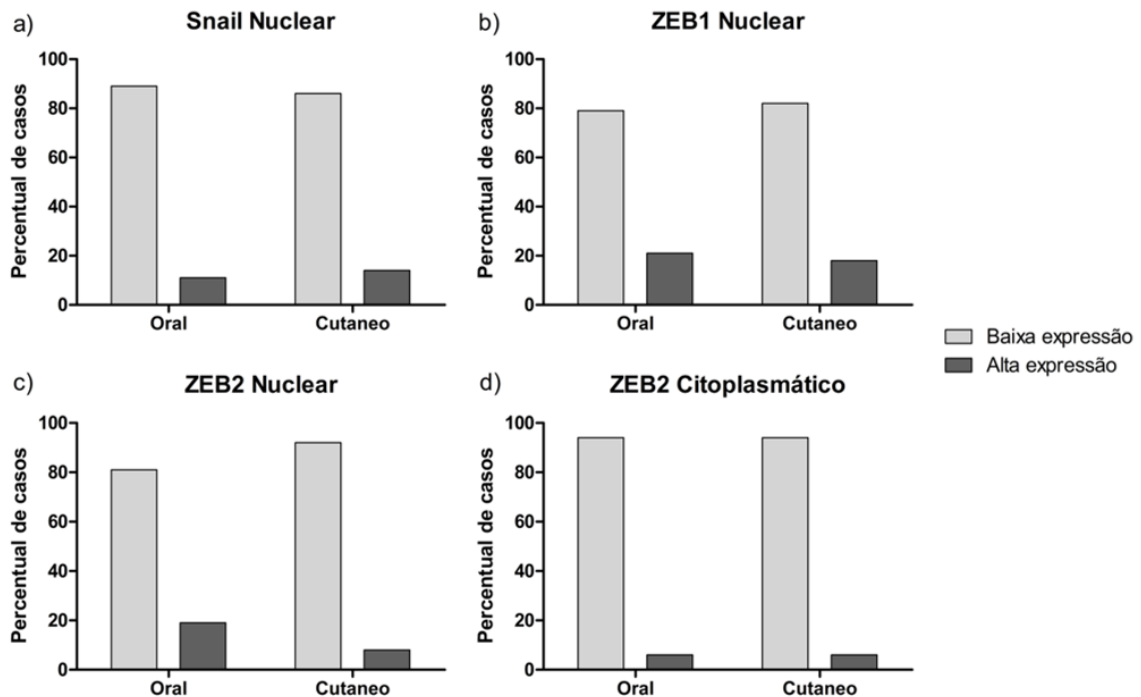


**Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de N-caderina.** A) Distribuição percentual segundo ausência/presença de N-caderina em melanomas orais e cutâneos. B/C) Distribuição percentual da expressão de N-caderina segundo localização celular em (B) melanomas orais e (C) cutâneos.

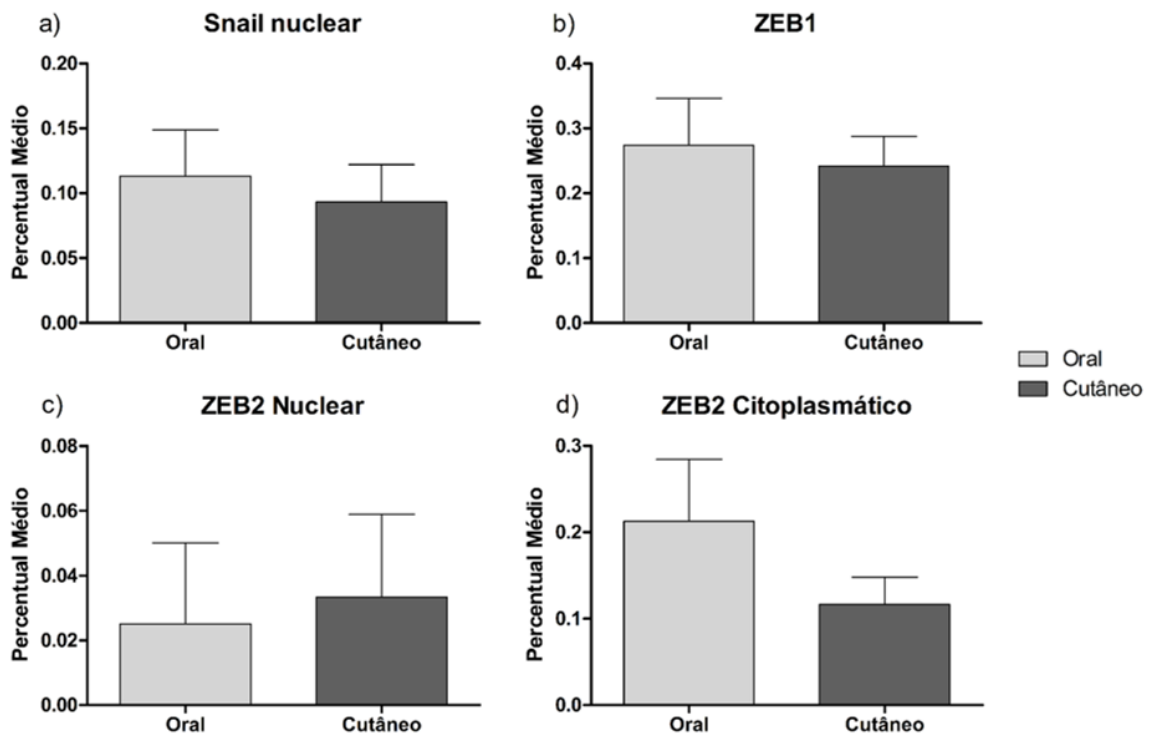


**Figura 4. Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão.** A) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear forte para Snail em 70% das células neoplásicas. B) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear moderada para ZEB1 em 90% das células neoplásicas. C) Melanoma oral com imunomarcção nuclear para ZEB2 em 90% das células neoplásicas. D) Melanoma oral com imunomarcção nuclear para Ki67. Barra 50µm.

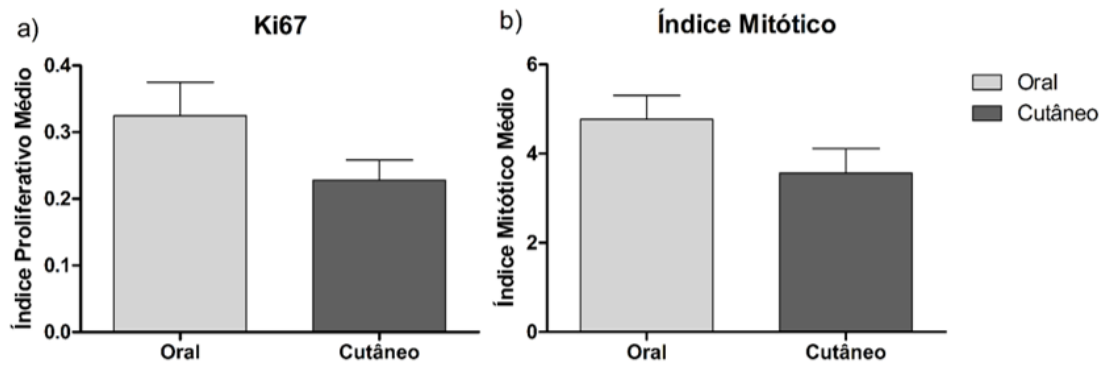




**Figura 5.** Distribuição percentual da expressão dos fatores de transcrição relacionados a transição epitélio-mesênquima (5A) Snail, (5B) ZEB1, (5C) ZEB2 nuclear, (5D) ZEB2 citoplasmático em melanomas caninos orais e cutâneos.



**Figura 6.** Percentual médio de expressão dos fatores relacionados a transição epitélio-mesênquima (6A) Snail, (6B) ZEB1, (6C) ZEB2 nuclear, (6D) ZEB2 citoplasmático em melanomas caninos orais e cutâneos.



**Figura 7. Atividade proliferativa de melanomas caninos orais e cutâneos. A)** Índice proliferativo médio segundo localização tumoral. **B)** Índice mitótico médio segundo localização tumoral.

## Tabelas e legendas

	Fabricante	Clone	Diluição	Tempo de Incubação	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário
<b>E-caderina</b>	Invitrogen	4A2C7	1:100	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>N-caderina</b>	Dako	6G11	1:50	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>Snail</b>	Abcam	Policlonal	1:100	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>ZEB1</b>	Sigma-Aldrich	Policlonal	1:200	1h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>ZEB2</b>	Sigma-Aldrich	Policlonal	1:100	1h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>Ki-67</b>	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melan-A</b>	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melanoma Antigen</b>	Santa Cruz	PNL-2	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink

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

	Distribuição de parâmetros clinicopatológicos		
	Orais (20/58, 34%)	Cutâneos (38/58, 66%)	P
<b>Tipo Histológico</b>			
Fusifforme	10%	32%	0,13
Epitelióides	90%	68%	
<b>Pigmentação</b>			
Amelanóticos	50%	16%*	0,01
Melanóticos	50%	84%*	
<b>Ulceração</b>			
Ausente	20%*	59%	0,01
Presente	80%*	41%	
<b>Êmbolos</b>			
Ausente	47%	49%	0,92
Presente	53%	51%	
<b>Atividade Juncional</b>			
Ausente	41%	73%*	0,05
Presente	59%	27%*	

**Tabela 2.** Percentual das características histológicas analisadas por localização tumoral. \* $p \leq 0.05$

Cut-offs (%)	
<b>Snail Nuclear</b>	27
<b>ZEB1 Nuclear</b>	54
<b>ZEB2 Nuclear</b>	37
<b>ZEB2 Citoplasmático</b>	17

**Tabela 3.** Cut-offs determinados segundo média+desvio padrão com base nos resultados de todos os casos.

## 7.2) Artigo 2

### **Relação entre os receptores de fator de crescimento epidérmico e características histológicas em melanomas caninos cutâneos e orais**

**Short Running Title:** Receptores ErbB em melanomas caninos

**Autores:** Emerson Soares Veloso, Ivy Nayra Nascimento Gonçalves, Tatiany Luiza Silveira, Fernando Soares Oliveira, Déborah Soares Vieira, Geovanni Dantas Cassali, Helen Lima Del Puerto, Enio Ferreira

**Afiliação:** Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

**Agradecimentos:** Os autores gostariam de agradecer a equipe do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais pelo suporte prestado e aos tutores dos animais envolvidos neste estudo. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações do Governo Brasileiro.

## **Relação entre os receptores de fator de crescimento epidérmico e características histológicas em melanomas caninos cutâneos e orais**

### **Resumo**

Os receptores de fator de crescimento epidérmico além de participarem de processos fisiológicos como regulação da morfogênese, proliferação e migração celular podem desempenhar importante papel na progressão neoplásica quando superexpressos ou superativados. Os melanomas constituem uma das mais agressivas neoplasias tanto em humanos quanto em cães, sendo a superexpressão de EGFR, Her-3 e Her-4 associada a pior prognóstico em melanomas humanos. Em cães, entretanto este evento ainda não foi avaliado. Desta forma este trabalho teve por objetivo caracterizar a expressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico em melanomas caninos bem como avaliar a relação entre estes receptores e características histopatológicas e imuno-histoquímicas indicativas de prognóstico. O índice proliferativo das lesões cutâneas apresentou-se associado ao aumento da expressão citoplasmática de Her-4 e redução de EGFR e Her-3. Em lesões orais, a expressão membranar de Her-2 associou-se com a presença de êmbolos, entretanto não foi observada amplificação gênica do *ERBB2*. Assim nosso trabalho evidencia a relação entre o Her-4 e o estímulo a proliferação e de EGFR e Her-3 no estímulo a diferenciação celular, além de relação entre Her-2 e a presença de êmbolos.

**Palavras-chave:** melanoma, EGFR's, cão.

## Introdução

Os receptores de fator de crescimento epidérmico, EGFR, Her-2, Her-3 e Her-4 participam da regulação da morfogênese, proliferação, migração e adesão celular<sup>1</sup>. Eles são proteínas transmembranares que apresentam um domínio extracelular, sítio de ligação do fator de crescimento epidérmico (EGF), um domínio transmembranar e outro citoplasmático, que possui atividade tirosinacinaase<sup>2</sup>. A atividade tirosinacinaase é ativada quando ocorre a dimerização do receptor a partir da ligação do EGF, o que leva a ativação direta ou indireta de vias de sinalização como Ras/MAPK, PLC $\gamma$ 1/PKC, Akt, e STAT, com consequente estímulo a proliferação e diferenciação celular<sup>3,4</sup>.

Em diferentes neoplasias observa-se que a superexpressão desses receptores estão relacionadas principalmente à progressão neoplásica e pior prognóstico<sup>5</sup>. A principal explicação para esta superexpressão é a amplificação gênica, sendo que em humanos a amplificação dos genes *ERBB*, e a polissomia do cromossomo 7, onde se localiza o gene do EGFR, é correlacionada com pior prognóstico dos pacientes com melanoma<sup>6</sup>.

Em melanomas humanos, a superexpressão de EGFR, Her-3 e Her-4 é relacionada a um pior prognóstico<sup>7,8</sup>. Em especial, o aumento da expressão de EGFR tem sido associada a uma reduzida taxa de sobrevida, ao maior tamanho tumoral, além de ser observada sua maior expressão nas metástases do que nos tumores primários<sup>6,9,10</sup>. Estudos *in vitro* e até mesmo *in silico* com linhagens celulares de melanoma humano e com o modelo experimental murino para melanoma tem demonstrado que os receptores de fator de crescimento epidérmico são alvos promissores para o tratamento<sup>11,12</sup>.

O melanoma canino, caracterizado pelo alto potencial invasivo e metastático, é considerado uma das neoplasias cutâneas mais agressivas em cães<sup>13,14</sup>, e que compartilha características clínicas, histológicas e moleculares com o melanoma em humanos<sup>15</sup>. Quando acomete a cavidade oral e os dígitos essas lesões apresentam pior prognóstico, com sobrevida por mais de 1 ano, mesmo quando aplicados tratamentos cirúrgicos e quimioterápicos, observada em apenas 10% dos casos<sup>14,16</sup>. Os fatores envolvidos com a carcinogênese do melanoma em cães ainda são controversos<sup>17</sup>, e não existem estudos a respeito da expressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico em melanomas caninos.

Estudos realizados em modelos experimentais murinos de melanoma demonstraram que a utilização de cetuximab, um anticorpo monoclonal que inibe a atividade do receptor de fator de



crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor* - EGFR) reduz a capacidade invasiva e suprime a formação de metástases<sup>11,18</sup>, contudo não são descritos esse tipo de tratamento em cães.

Frente a agressividade e relevância clínica dos melanomas caninos, temos como objetivo caracterizar a expressão dos receptores EGFR, Her-2, Her-3 e Her-4 em melanomas caninos cutâneos e de cavidade oral e sua relação com características histopatológicas e o índice proliferativo dessas neoplasias.

## **Materiais e Métodos**

### *Aspectos Éticos*

Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos para uso de animais em experimentação e após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA/CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 008/2016).

### *Espécimes*

Foram analisados 58 casos de melanoma provenientes do acervo do Laboratório de Patologia Comparada da UFMG, que foram obtidos de cães de diversas raças submetidos a exérese cirúrgica no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais, e do acervo do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas amostras recebidas entre os anos de 2005 e 2017.

### *Avaliação Histopatológica*

Os espécimes coletados foram, após a exérese cirúrgica, fixados em formol neutro e tamponado a 10%, incluídos em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina sendo então analisados em microscopia ótica para classificação segundo os parâmetros da Organização Mundial da Saúde<sup>19</sup>. Aqueles classificados como melanomas foram incluídos no estudo e realizou-se a determinação do escore de pigmentação das lesões (0: ausência de células neoplásicas pigmentadas; 1: 1-25% de células neoplásicas pigmentadas; 2: 26-50% de células neoplásicas pigmentadas e 3: >51% de células neoplásicas pigmentadas), bem como o índice mitótico e a presença de êmbolos, ulceração, desmoplasia e atividade juncional (lentiginosa ou pagetoide). O índice mitótico foi determinado segundo a média do número de mitoses em 10 campos de maior aumento (CMA), sendo considerado de elevado índice mitótico as lesões orais que apresentaram índice  $\geq 4/\text{CMA}$ , e as cutâneas com índice  $\geq 3/\text{CMA}$ .

### *Imuno-histoquímica*

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário polimerizado (*Advance™ HRP*; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA ou *Novolink Polymer Detection Sistem*; Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK ou *Histofine® Simple Stain MAX PO (MULTI)*, Nicherei Fresh Inc., Chun, Tokyo, Japan). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido (banho-maria a 98°C) ou calor úmido pressurizado a 125°C (*Pascal® Pressure Cooker*; Dako Cytomation, Glostrup,

Denmark) com *Target Retrieval Solution Citrate - pH 6,0* (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) ou EDTA pH 9,0. Outro método de recuperação antigênica utilizado foi a recuperação enzimática com pepsina a 37°C por 30 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por dois tempos de 10 minutos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em álcool metílico. Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em *Protein Block Serum-Free Ready to Use* (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 30 minutos (anti-Her-3), ou 16 horas (anti-EGFR, anti-Her-2, anti-Her-4 anti-Ki67, anti-MelanA e anti-Melanoma Antigen) e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate Chromogen system*; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 1 minuto. Após a incubação no DAB os cortes foram contracorados com Giemsa (1:5) por 30 minutos e então rinsados em solução de ácido clorídrico (1:100), álcool absoluto e por fim ácido isopropílico. Com este tratamento após a contracoloração o pigmento melânico adquire tonalidade esverdeada, permitindo a visualização amarronzada da reação cromogênica com DAB. Na Tabela 1 estão 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).

#### *Interpretação da Imuno-histoquímica*

As análises histológicas foram realizadas em microscopia óptica convencional, em aumento de 40x (Olympus – BX41), sendo o anticorpo anti-Melan-A utilizado para comprovar o diagnóstico de melanoma em todas amostras estudadas, além disso, em todas as amostras de melanoma amelanótico (pigmentação 0) e naquelas que foram negativas para a expressão de Melan-A realizou-se também a imuno-histoquímica para anti-Melanoma Antigen (PNL-2). Foram considerados positivos os casos que apresentaram marcação citoplasmática em mais que 10% das células neoplásicas, para qualquer um dos marcadores (Smedley et al., 2011).

A expressão de EGFR e Her-2 foi avaliada na membrana de células neoplásicas e classificada segundo o escore 0: marcação membranar ausente ou incompleta muito fraca em menos de 10% das células; 1+: marcação membranar incompleta muito fraca em mais de 10% das células; 2+: marcação membranar incompleta fraca ou moderada em mais de 10% das células ou completa intensa em menos de 10% das células; 3+: marcação membranar completa intensa em mais de 10% das células (Adaptado do sistema de pontuação *Herceptest*® Dako). Avaliamos ainda a

expressão citoplasmática de Her-2 classificando os casos segundo o percentual de células imunomarcadas: 0: ausência de marcação; 1+: marcação citoplasmática em menos que 10% das células neoplásicas; 2+: marcação citoplasmática em 10 a 30% das células neoplásicas; 3+: marcação citoplasmática em 30-60% das células neoplásicas e 4+: marcação citoplasmática em mais que 60% das células neoplásicas.

A expressão de Her-3 foi avaliada no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas separadamente e classificada segundo o escore 0: ausência de marcação; 1+: fraco; 2+: moderado; 3+ forte de acordo com a intensidade de marcação em pelo menos 30% das células<sup>20</sup> e determinamos ainda, de maneira semiquantitativa, o percentual de células marcadas.

A expressão de Her-4 foi avaliada no núcleo, citoplasma e membrana de células neoplásicas separadamente e classificada segundo o escore 0: ausência de marcação; 1+: fraco; 2+: moderado; 3+ forte de acordo com a intensidade de marcação em pelo menos 10% das células<sup>21</sup>.

Para determinar o índice proliferativo das lesões utilizamos a imuno-histoquímica com o anticorpo anti-Ki67, onde obtivemos o percentual de células neoplásicas com núcleo imunomarcado a partir da análise de 500 células, em campos histológicos de maior aumento (40X). Foram consideradas de alto índice proliferativo as lesões orais com percentual  $\geq 19,5$  e as cutâneas com percentual  $\geq 15$ <sup>22</sup>.

#### *Hibridização in situ com Revelação Cromogênica (CISH)*

Para avaliar o número de cópias do cromossomo 17 e gene *ERBB2* foi realizada a técnica de hibridização *in situ* com revelação cromogênica com o kit para detecção CISH SPOT-Light Chromogenic ISH (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA). Secções histológicas de 4 $\mu$ m das lesões selecionadas foram hidratadas e pré-tratadas de acordo com os protocolos fornecidos pelo fabricante. Em sequência, as lâminas foram incubadas com a sonda do gene Her-2 (SPOT-Light HER-2 Probe), no Hybridizer Dako por 5 minutos à temperatura de 90°C e 10 horas (overnight) à temperatura de 37°C. A sonda hibridizada foi detectada utilizando o sistema de detecção CISH Polymer Detection Kit II e os tecidos foram contra-corados com Hematoxilina de Mayers por 10 segundos. Como controles positivos foram usadas amostras de mama humana previamente testada.

A análise e interpretação da hibridização foi realizada de acordo com as recomendações fornecidas pelo fabricante junto ao protocolo do kit. Para a análise da hibridização foram

contadas 30 células neoplásicas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Amostras que apresentaram de 1 a 4 cópias do gene em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas sem amplificação, aquelas com 5-10 cópias ou pequenos aglomerados em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas de baixa amplificação, já as que apresentaram mais de 10 cópias ou grandes aglomerados em cada núcleo em mais de 50% das células neoplásicas foram consideradas de alta amplificação.

#### *Análise Estatística*

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

## Resultados

### *Expressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico*

A expressão de EGFR (Figura 1A e 1B) foi observada em 25% dos casos orais e 53% dos casos cutâneos, sendo os casos com superexpressão desta proteína (escore 3) correspondentes a apenas 5% dos orais e 16% dos cutâneos (Figura 2A).

A expressão membranar de Her-2 (Figura 1C e 1D) foi observada em 50% dos casos orais e 43% dos casos cutâneos, e em nenhum caso observamos o escore 3 (Figura 2B). A expressão citoplasmática de Her-2 foi discretamente presente nos tumores orais (30% dos casos) e fraca nos cutâneos (46% dos casos).

A expressão membranar de Her-3 não foi observada em nenhum caso analisado. A expressão citoplasmática (Figura 3A) em apenas 18% dos casos orais e 6% dos casos cutâneos (Figura 4A), sendo a média de células neoplásicas positivas por caso de apenas 9% para os casos orais e 3% para os casos cutâneos (Figura 4B). A expressão nuclear (Figura 3B) foi observada em 41% dos casos orais e 44% dos casos cutâneos (Figura 4C), sendo a média de células neoplásicas positivas de 26% para os orais e 17% para os cutâneos (Figura 4D).

A expressão de Her-4 (Figura 3C e 3D) no citoplasma foi predominantemente fraca em 42% dos casos orais e 38% dos casos cutâneos (Figura 5A). A expressão membranar presente em 21% dos orais e 68% dos cutâneos (Figura 5B). A expressão nuclear presente somente em 16% dos orais e 11% dos cutâneos (Figura 5C).

### *Proliferação celular e expressão de receptores de fator de crescimento epidérmico*

A análise de expressão de Ki-67 determinou um índice proliferativo médio de  $22,06 \pm 15,09$ , em melanomas cutâneos, e de  $32,30 \pm 18,18$  em melanomas orais, sem diferença estatística entre eles.

Foi observada um índice mitótico médio foi de  $4,71 \pm 2,00$  em melanomas orais e de  $3,56 \pm 2,87$  em melanomas cutâneos, sem diferença estatística e sem associações com a positividade dos receptores de fator de crescimento.

Nas amostras cutâneas a elevação do índice proliferativo apresentou correlação com o aumento da expressão citoplasmática de Her-4 ( $r: 0.4510$ ;  $p: 0.0308$ ) e a redução da expressão de EGFR ( $r: -0.4468$ ;  $p: 0.0326$ ) e Her-3 ( $r: -0.5465$ ;  $p: 0.0070$ ), além de ser menor nas lesões com

desmoplasia (r: -0.4232; p: 0.0442). Já nas lesões orais observou-se correlação apenas com o diagnóstico epitelióide (r: 0.5698; p: 0.0421).

*Relação entre os receptores de fator de crescimento epidérmico e características histológicas*

A maior expressão de EGFR apresentou correlação com a menor expressão de Her-2 citoplasmático (r: -0.3357; p: 0.0422) nos melanomas cutâneos. Em melanomas orais tal evento não foi observado.

A expressão de Her-2 membranas apresentou correlação com o diagnóstico epitelióide, quando comparado ao diagnóstico fusiforme (r: 0.3851; p: 0.0186) e ao aumento da expressão de Her-3 nuclear (r: 0.3806; p: 0.0241) nas lesões cutâneas. Em melanomas orais, a expressão membranas de Her-2 apresentou correlação com a presença de êmbolos (r: 0.4578; p: 0.0487) e expressão citoplasmática de Her-3 (r: 0.6720; p: 0.0031). Em ambas as localizações foi observada ainda uma relação entre a expressão membranas de Her-2 e expressão membranas de Her-4 (r: 0.4669; p: 0.0041, nos cutâneos e r: 0.4885; p: 0.0338, nos orais). Já a expressão citoplasmática de Her-2 apresentou-se associada a menor expressão de Her-4 citoplasmático nas lesões orais (r: -0.5291; p: 0.0198).

A expressão citoplasmática de Her-3 apresentou associação com o aumento da expressão membranas de Her-4 nas lesões cutâneas (r: 0.3981; p: 0.0179) e orais (r: 0.5012; p: 0.0404). Além disso, a expressão citoplasmática de Her-4 foi associada ao diagnóstico epitelióide (r: 0.4235; p: 0.0090) e a presença de desmoplasia (r: 0.4958; p: 0.0018) nas lesões cutâneas e ao diagnóstico epitelióide nas lesões orais (r: -0.4643, p: 0.0452).

*Amplificação do gene ERBB2*

A CISH foi realizada em 4 melanomas orais (1 com expressão imuno-histoquímica de Her-2) e 9 melanomas cutâneos (5 com expressão imuno-histoquímica de Her-2) porém todas as amostras apresentaram no máximo 4 cópias do gene, sendo consideradas sem amplificação gênica (Figura 6A e 6B).

## Discussão

O melanoma canino é uma importante neoplasia devido a sua alta mortalidade e por apresentar características em comum com a manifestação em humanos<sup>15</sup>. Alguns trabalhos têm relatado a participação dos receptores de fator de crescimento epidérmico na progressão do melanoma em humanos, porém trabalhos neste âmbito ainda não foram desenvolvidos com melanomas caninos.

Nossos dados demonstram uma relação entre o aumento da expressão de Her-4 citoplasmático e elevados índice de proliferação em melanomas cutâneos. A isoforma citoplasmática do Her-4 foi descrita em 1999 e ocorre devido a mutações que geram a perda de 16 aminoácidos do receptor<sup>23</sup>. A presença desta isoforma foi associada a pior prognóstico quando identificada em linfonodos de pacientes humanos com melanoma metastático<sup>24</sup>. Já em lesões primárias Zhu e colaboradores, 2018 demonstraram em um recente trabalho a expressão citoplasmática de Her-4 em melanomas de mucosa sinonasal e sua associação como um marcador independente de pior prognóstico<sup>25</sup>. As mutações no gene *ERBB4*, codificador do Her-4, foram associadas ainda ao ganho de funções oncogênicas no melanoma em humanos<sup>8</sup>. Observamos ainda uma relação direta entre a expressão de Her-4 membranar com Her-2 na membrana e Her-3 no citoplasma. Associações entre os receptores de fator de crescimento epidérmico são descritas como importantes para amplificação e/ou reconstituição da atividade tirosinacinaase ou ainda da afinidade aos ligantes por facilitarem a heterodimerização<sup>26</sup>. Desta forma, a expressão de Her-4, seja membranar ou citoplasmática, em melanomas caninos é associada a parâmetros indicativos de pior prognóstico, como a associação com elevado índice proliferativo.

A expressão de Her-3 foi observada principalmente no núcleo das células neoplásicas, e apresentou correlação negativa com o índice proliferativo nas lesões cutâneas. A expressão membranar de Her-3, não observada nos casos analisados, foi demonstrada como um marcador de pior prognóstico em estudos *in vitro* e *in vivo* com melanoma humano<sup>7</sup>, já a expressão nuclear do receptor é demonstrada como um sinal de bom prognóstico por estar associado a maior tempo de sobrevida em melanomas humanos<sup>27</sup> o que corrobora nosso achado referente a correlação da expressão membranar com reduzido ao índice proliferativo. Controversamente apesar da expressão de Her-3 nuclear ser associada a melhor prognóstico existem evidências de que a translocação deste receptor para o núcleo ocorre por um mecanismo relacionado a resistência a tratamentos com inibidores do EGFR<sup>28</sup>. Outros autores demonstram que a translocação do Her-3 para o núcleo só ocorre em células que coexpressam outros receptores



de fator de crescimento epidérmico<sup>29</sup>. Assim, a expressão nuclear de Her-3 em melanomas caninos parece ser um indicativo de bom prognóstico, como em humanos, já a sua translocação, por estar associada a melhor prognóstico, não deve ser indicativo de resistência celular e sim de coexpressão de outros receptores de fator de crescimento epidérmico.

Evidenciamos também a correlação entre Her-3 citoplasmático e nuclear com a expressão membranar de Her-2. O Her-3 é o único membro da família de receptores de fator de crescimento epidérmico que é considerado uma pseudocinase inativa, por não possuir um domínio com atividade tirosinacinaase funcional, o que torna necessário a formação de heterodímeros para que este receptor passe a ser funcional<sup>30</sup>, o que explica a relação observada entre a expressão de Her-2/Her-3 no modelo estudado e demonstra que em melanomas caninos a interação Her-2/Her-3 pode ser a alternativa para ativação do Her-3, mesmo que para estímulo a diferenciação celular, visto que este receptor parece não estar relacionado ao estímulo a proliferação nos casos estudados.

A superexpressão membranar de Her-2 e amplificação gênica do *ERBB2* não foram observadas em nenhum dos casos analisados, porém mesmo com esse cenário, a expressão membranar apresentou-se associada a presença de êmbolos nas lesões orais. Os trabalhos que abordam a expressão deste receptor em melanomas humanos ainda são controversos. Similarmente aos nossos resultados Shayanfar e colaboradores, 2015 descreveram a ausência de superexpressão do receptor na membrana, bem como a ausência de amplificação gênica<sup>31</sup>, descrita também por Kluger e colaboradores, 2004<sup>32</sup> implicando na não aplicabilidade deste receptor como um biomarcador para determinação de prognóstico em melanomas. Resultados similares também foram descritos também por Potti e colaboradores que observaram superexpressão membranar de Her-2 em apenas 0,9% dos casos estudados<sup>33</sup>. Já Bodey e colaboradores descreveram a superexpressão do receptor em melanomas humanos<sup>34</sup>. Um limitante dos estudos, em humanos, com este receptor tem sido o reduzido número de casos. Nossos dados apesar de, em parte, serem similares ao descrito na literatura como indícios de que este receptor não tem valor prognóstico demonstram também uma relação com a presença de êmbolos, o que demonstra uma relação com a progressão neoplásica.

A superexpressão membranar de EGFR também foi observada em poucos casos, sendo a presença deste receptor relacionada a redução do índice proliferativo nas lesões cutâneas, o que contradiz resultados observados em melanomas humanos, onde este receptor participa dos estímulos proliferativos de melanócitos<sup>35</sup> e é associado com pior prognóstico dos melanomas<sup>18</sup>.

Nos melanomas caninos este receptor pode estar associado então aos estímulos para suas outras funções, como diferenciação celular ou autofagia<sup>36,37</sup>.

Com este trabalho demonstramos assim a relação entre o índice proliferativo dos melanomas caninos e o aumento da expressão citoplasmática de Her-4 e redução da expressão de EGFR e Her-3 em lesões cutâneas, além de relação entre a expressão membranar de Her-2 e a presença de êmbolos, mesmo sem amplificação genica do *ERBB2*. Assim podemos concluir que o Her-4 provavelmente está ligado ao estímulo para proliferação das células neoplásicas, enquanto o EGFR e Her-3 não estão associados a nenhum dos parâmetros estudados, e que a expressão membranar de Her-2 possui características indicativas de pior prognóstico em melanomas caninos.

### Conflito de Interesses:

Os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesse em relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

### Referências

1. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(2):127-137.
2. Fry WHD, Kotelawala L, Sweeney C, Carraway KL. Mechanisms of ErbB receptor negative regulation and relevance in cancer. *Exp Cell Res.* 2009;315(4):697-706.
3. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(3):903-913.
4. Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(18):5268-5272.
5. Nicholson RI, Gee JM, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer.* 2001;37 Suppl 4:S9-15.
6. Rákósy Z, Vízkeleti L, Ecsedi S, et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer.* 2007;121(8):1729-1737.
7. Reschke M, Mihic-Probst D, van der Horst EH, et al. HER3 is a determinant for poor prognosis in melanoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5188-5197.
8. Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet.* 2009;41(10):1127-1132.
9. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998;58(10):2170-2175.
10. Udart M, Utikal J, Krähn GM, Peter RU. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. *Neoplasia.* 2001;3(3):245-254.
11. Naramura M, Gillies SD, Mendelsohn J, Reisfeld RA, Mueller BM. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 1993;37(5):343-349.
12. Tworkoski K, Singhal G, Szpakowski S, et al. Phosphoproteomic screen identifies potential therapeutic targets in melanoma. *Mol Cancer Res.* 2011;9(6):801-812.
13. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008;451(7176):345-349.
14. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter V k. Clinical and Histopatological Diagnosis. In: *Skin Diseases of the Dog and Cat.* ; 2005:406-410.

15. Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):37-47.
16. Brockley L, Cooper M, Bennett P. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. *N Z Vet J.* 2013;61(1):25-31.
17. Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* 1999;13(3):163-174.
18. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L, et al. EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *J Cutan Pathol.* 2011;38(6):492-502.
19. Goldschmidt MH, Dustan RW, Stannard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: *World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals.* Vol 2; 1998:38-41.
20. Kim JH, Im KS, Kim NH, Yhee JY, Nho WG, Sur JH. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. *Vet J.* 2011;189(3):318-322.
21. Hollmén M, Liu P, Kurppa K, et al. Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(6):e39413.
22. Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol.* 2011;48(1):54-72.
23. Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidyl inositol 3-kinase. *Oncogene.* 1999;18(16):2607-2615.
24. Nielsen TO, Poulsen SS, Journe F, Ghanem G, Sorensen BS. HER4 and its cytoplasmic isoforms are associated with progression-free survival of malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2014;24(1):88-91.
25. Zhu W, Li S, Zou B, Liu H, Wang S. Expressions and clinical significance of HER4 and CD44 in sinonasal mucosal malignant melanoma. *Melanoma Res.* January 2018:1.
26. Sliwkowski MX, Schaefer G, Akita RW, et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J Biol Chem.* 1994;269(20):14661-14665.
27. Trocmé E, Mougiakakos D, Johansson CC, et al. Nuclear HER3 is associated with favorable overall survival in uveal melanoma. *Int J Cancer.* 2012;130(5):1120-1127.
28. Brand TM, Iida M, Corrigan KL, et al. The receptor tyrosine kinase AXL mediates nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor. *Sci Signal.* 2017;10(460):eaag1064.
29. Zscheppang K, Korenbaum E, Bueter W, Ramadurai SM, Nielsen HC, Dammann CEL. ErbB receptor dimerization, localization, and co-localization in mouse lung type II epithelial cells. *Pediatr Pulmonol.* 2006;41(12):1205-1212.

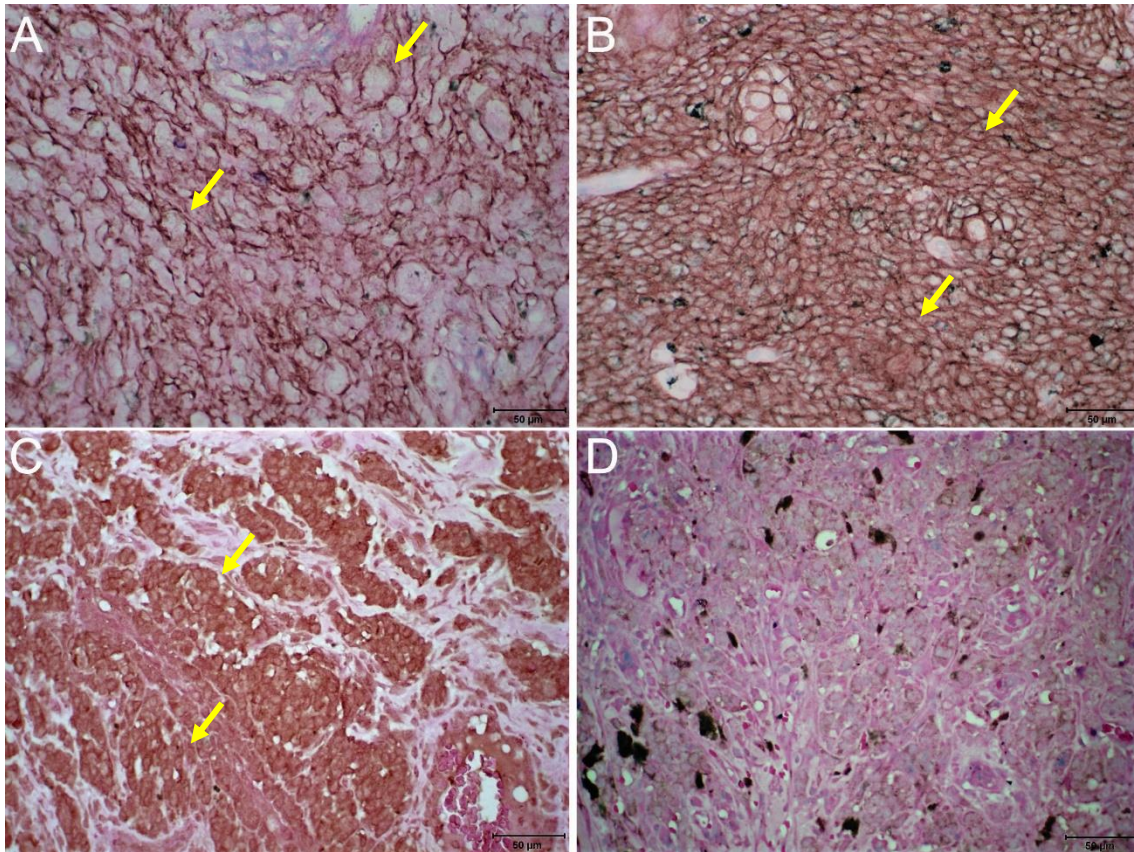
30. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 2006;16(12):649-656.
31. Shayanfar N, Bahari L, Safaie-Naraghi Z, Kamyab K, Gheytauchi E, Rezaei N. Negative HER2/neu amplification using immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization techniques in skin melanoma cases. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(2):421-425.
32. Kluger HM, DiVito K, Berger AJ, et al. Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma - a large cohort tissue microarray study. *Melanoma Res.* 2004;14(3):207-210.
33. Potti A, Hille RC, Koch M. Immunohistochemical determination of HER-2/neu overexpression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) overexpression exhibits potential therapeutic implications. *J Carcinog.* 2003;2(1):8.
34. Bodey B, Bodey B, Gröger AM, et al. Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res.* 1997;17(2B):1319-1330.
35. Yun WJ, Bang SH, Min KH, Kim SW, Lee MW, Chang SE. Epidermal growth factor and epidermal growth factor signaling attenuate laser-induced melanogenesis. *Dermatol Surg.* 2013;39(12):1903-1911.
36. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(1):3-20.
37. Tan X, Lambert PF, Rapraeger AC, Anderson RA. Stress-Induced EGFR trafficking: mechanisms, functions, and therapeutic implications. *Trends Cell Biol.* 2016;26(5):352-366.

**Tabelas:****Tabela 1.** Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica e suas características técnicas

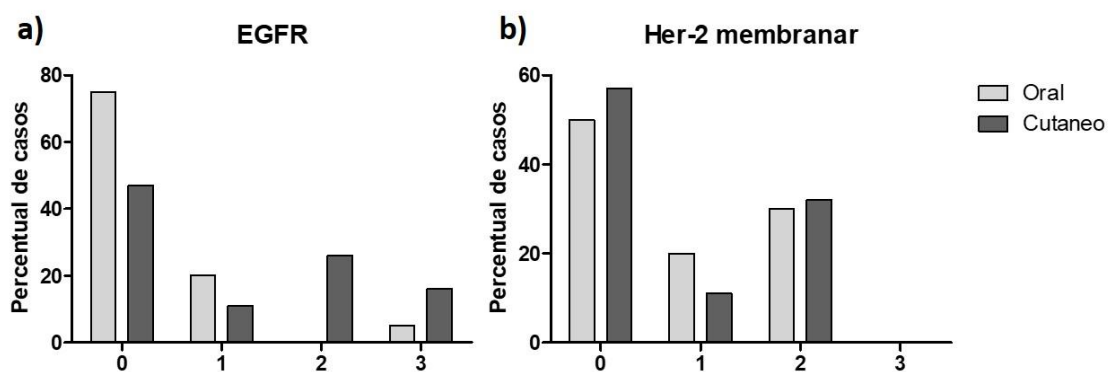
	<b>Fabricante</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tempo de Incubação</b>	<b>Recuperação antigênica</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
<b>EGFR</b>	Invitrogen	31G7	1:50	16h	Recuperação enzimática	HRP
<b>Her-2</b>	Dako	Policlonal	1:200	16h	Citrato + calor úmido	HRP
<b>Her-3</b>	Genetex	Policlonal	1:100	30minutos	EDTA + calor úmido	Histofine
<b>Her-4</b>	Santa Cruz	C18	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Histofine
<b>Ki-67</b>	Dako	MIB-1	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melan-A</b>	Dako	A103	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink
<b>Melanoma Antigen</b>	Santa Cruz	PNL-2	1:100	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Novolink

**Tabela 1.** Lista de anticorpos, com os respectivos fabricantes, clones, diluição, tempo de incubação, método de recuperação antigênica e anticorpo secundário segundo padronização realizado ao início do projeto.

**Figuras:**

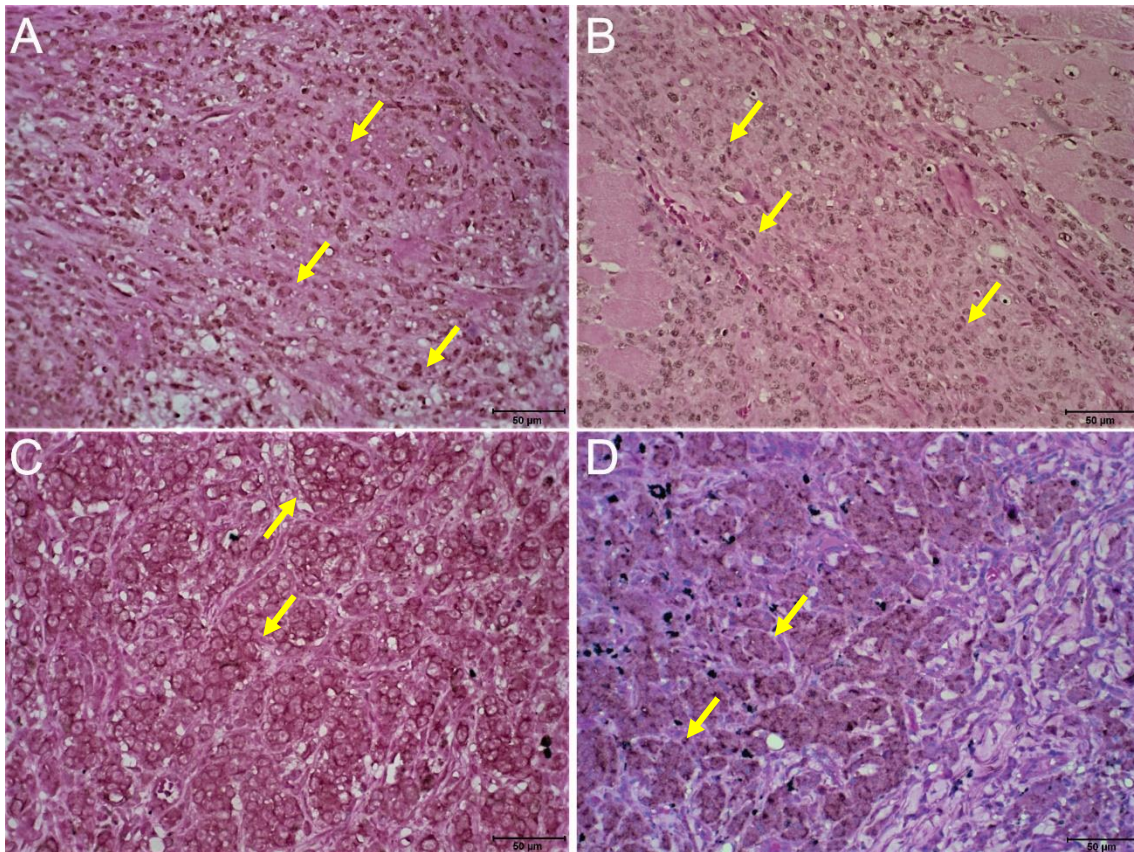


**Figura 1. Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão.** A) Melanoma cutâneo com imunomarcagem membranar 3+ para EGFR. B) Melanoma oral com imunomarcagem membranar 3+ para EGFR. C) Melanoma cutâneo com imunomarcagem membranar 3+ e citoplasmática moderada em 10 a 30% das células neoplásicas para Her-2. D) Melanoma oral sem imunomarcagem para Her-2. Barra 50µm.

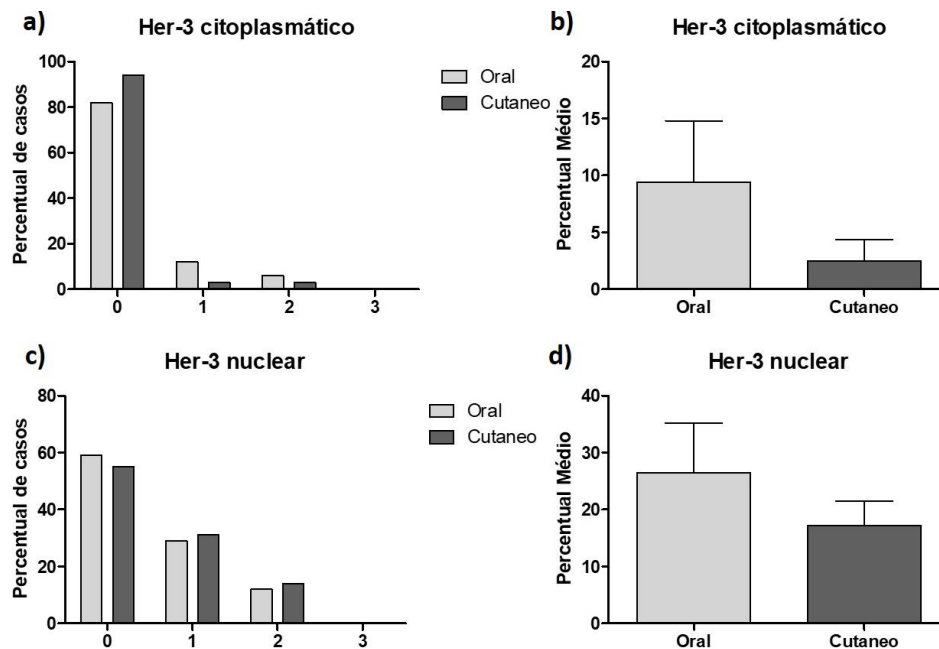


**Figura 2. Expressão imuno-histoquímica de EGFR e Her2.** A) Distribuição percentual por escore da expressão de EGFR em melanomas orais e cutâneos. B) Distribuição percentual por escore da expressão de Her-2 em melanomas orais e cutâneos.



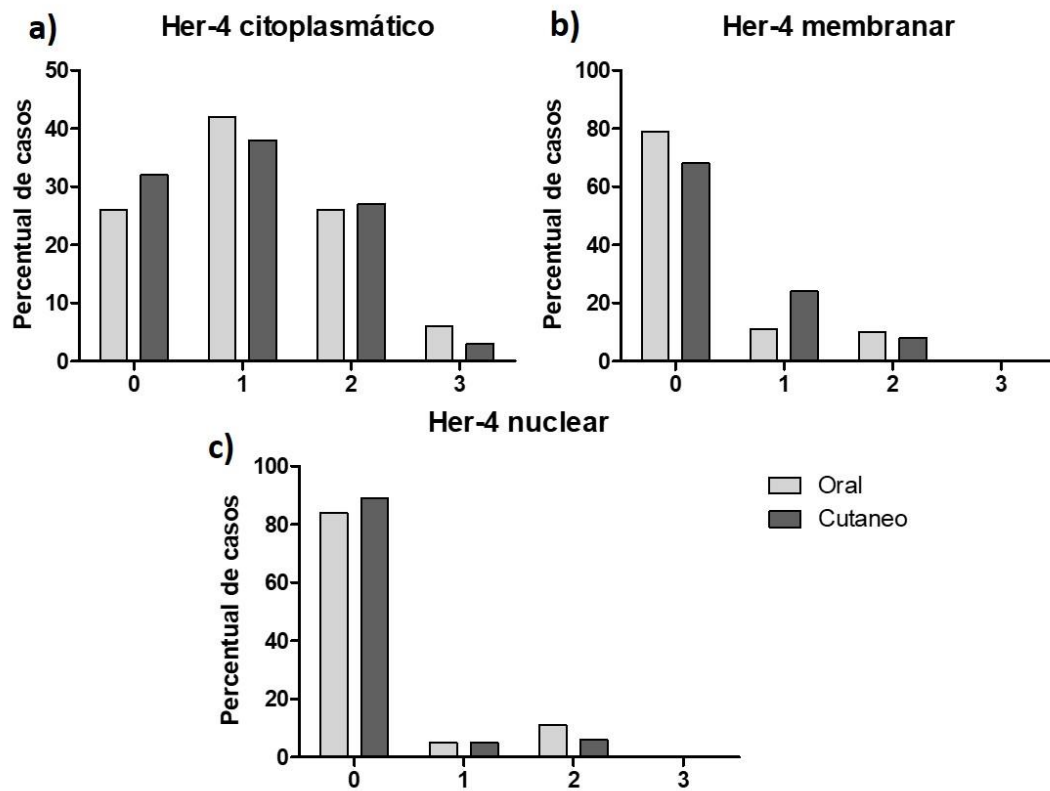


**Figura 3. Fragmento de melanoma, imuno-histoquímica. Cão.** A) Melanoma cutâneo com imunomarcção nuclear e citoplasmática moderada para Her-3. B) Melanoma oral com imunomarcção nuclear para Her-3. C) Melanoma cutâneo com imunomarcção membranar moderada para Her-4. D) Melanoma oral com imunomarcção citoplasmática e nuclear fraca para Her-4. Barra 50µm.

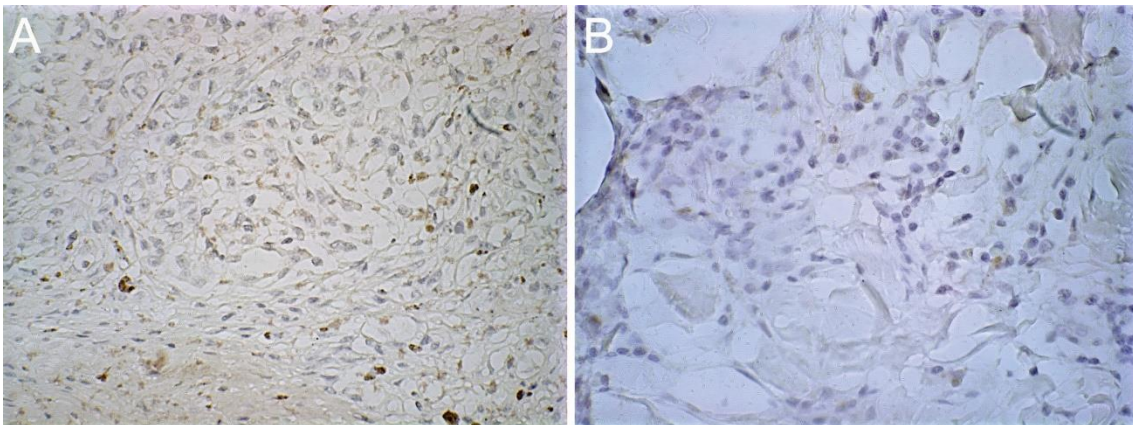


**Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de Her-3.** A) Distribuição percentual por escore da expressão de Her-3 citoplasmático em melanomas caninos orais e cutâneos. B) Percentual médio de expressão de Her-3 citoplasmático em células neoplásicas de melanomas caninos orais e cutâneos. C) Distribuição percentual por escore da expressão de Her-3 nuclear em melanomas orais e cutâneos. D) Percentual médio de expressão de Her-3 nuclear em células neoplásicas de melanomas caninos orais e cutâneos.





**Figura 5.** Distribuição percentual por escore da expressão de Her-4 (A) citoplasmática; (B) membranáar e (C) nuclear em melanomas caninos orais e cutâneos.



**Figura 6.** Fragmento de melanoma, hibridização *in situ* com revelação cromogênica. Cão. 600X. A) Melanoma cutâneo sem amplificação gênica de *ERBB2*. B) Melanoma oral sem amplificação gênica de *ERBB2*.

## 8. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo e nas condições metodológicas empregadas, podemos concluir que:

- Melanomas caninos apresentam perda da expressão de E-caderina e ganho de N-caderina, caracterizando a ocorrência da transição epitélio-mesênquima nesta neoplasia.
- A expressão de N-caderina foi visualizada principalmente no citoplasma e núcleo das células neoplásicas, demonstrando a translocação desta proteína da membrana para estas sublocalizações celulares.
- A translocação da N-caderina parece ser regulada pelo fator de transcrição ZEB1, que foi associado a expressão não-membranar observada em nossos casos.
- A regulação da expressão de N-caderina pelo fator de transcrição Snail depende do sítio anatômico acometido pela neoplasia, naquelas de cavidade oral o Snail é relacionado ao aumento expressão de N-caderina, já nas lesões cutâneas este fator é relacionado à redução da expressão de N-caderina.
- O Her-2 e Her-4 estão ligados a presença de êmbolos e maior índice proliferativo respectivamente, características indicativas de pior prognóstico dos melanomas caninos, ao contrário do EGFR e Her-3 que não apresentaram nenhuma associação com os parâmetros estudados.
- Não foram observados sinais de amplificação gênica para *ERBB2* nos melanomas caninos orais e cutâneos estudados.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melanoma canino representa uma importante neoplasia devido sua alta agressividade e impacto na sobrevivência dos pacientes, além de ser considerado um bom modelo pré-clínico em oncologia comparada, entretanto as vias envolvidas na carcinogênese e progressão desta neoplasia ainda não são bem esclarecidas, dificultando o trabalho do oncologista veterinário já que não existem protocolos determinados ou mesmo terapias-alvo. Alguns eventos moleculares são propostos como importantes no contexto de outras neoplasias tanto humanas quanto veterinárias, incluindo o melanoma humano e conhecer prováveis vias envolvidas na progressão de qualquer neoplasia é sempre de fundamental importância para elucidar possíveis rotas terapêuticas.

Um evento característico da progressão neoplásica é a transição epitélio-mesênquima, um fenômeno que fisiologicamente apresenta diversas funções mas que no âmbito neoplásico encontra-se desregulado favorecendo a agressividade e resistência das células neoplásicas. Este evento é bem descrito em diversas neoplasias humanas e também em algumas neoplasias caninas, porém no melanoma canino pouco se conhece sobre seus efeitos. E também nas outras neoplasias, tanto humanas quanto caninas, algumas questões no sentido da regulação e conferência de resistência as células neoplásicas ainda permanecem obscuras. Nosso trabalho demonstra a ocorrência da transição epitélio-mesênquima nos melanomas caninos e mais interessante ainda a translocação da N-caderina para citoplasma e núcleo aparentemente regulada pelo fator de transcrição ZEB1, além de uma regulação local-dependente da expressão de N-caderina via Snail. Trabalhos adicionais são necessários para melhor compreensão de toda a complexidade envolvida na TEM, como os mecanismos moleculares envolvidos no estímulo para sua ocorrência, na regulação da expressão das caderinas e interação célula-célula e célula-matriz e na resistência observada nas células neoplásicas que sofrem a TEM. Nosso relato neste trabalho torna-se interessante justamente para justificar mais estudos nos aspectos citados.

A superexpressão dos receptores de fator de crescimento epidérmico, na maioria das neoplasias em que é relatada associa-se a maior índice proliferativo e pior prognóstico, sendo inclusive uma importante ferramenta terapêutica para neoplasias mamárias humanas. Em neoplasias caninas a associação entre estes receptores e a progressão neoplásica não é bem definida e em melanomas nem mesmo estudada por outros grupos, talvez porque a alternativa terapêutica dos inibidores de receptor de fator de crescimento epidérmico ainda não seja viável para a medicina veterinária devido a seu elevado custo mesmo para humanos. Mesmo neste cenário

consideramos importante o conhecimento destas características para melhor entendimento da biologia tumoral envolvida nas neoplasias caninas, em especial o melanoma. Os receptores de fator de crescimento epidérmico, Her-2 e Her-4, também foram demonstrados neste estudo como importantes para a progressão neoplásica dos melanomas caninos, ao contrário dos outros membros da família, os receptores EGFR e Her-3, que não se associaram com características indicativas de pior prognóstico.

Trabalhos que busquem associar a expressão destes receptores, assim como das moléculas relacionadas a TEM, com a sobrevida dos animais acometidos pelo melanoma são imprescindíveis para real determinação do seu valor prognóstico, entretanto uma limitação encontrada na medicina veterinária é a difícil rastreabilidade dos pacientes e seus tutores e ainda a determinação da *causa mortis* visto que por vezes o óbito dos pacientes não acontece no ambiente hospitalar e as necropsias raramente são autorizadas pelos tutores. A alternativa então é a realização de estudos funcionais que busquem elucidar as vias e funções envolvidas com estas moléculas, receptores de fator de crescimento e as ligadas a TEM, e também a avaliação de possíveis fármacos para controle destas vias.

## 10. REFERÊNCIAS

- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1438–49, 1 jun. 2009.
- ALIZADEH, A. M.; SHIRI, S.; FARSINEJAD, S. Metastasis review: from bench to bedside. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8483–8523, 8 set. 2014.
- ALONSO, S. R. et al. A High-Throughput Study in Melanoma Identifies Epithelial-Mesenchymal Transition as a Major Determinant of Metastasis. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3450–3460, 1 abr. 2007.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Facts & Figures 2018: Rate of Deaths From Cancer Continues Decline**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/esophagus-cancer.html>>. Acesso em: 12 jan. 2018.
- ANDERSON, D. J. Genes, lineages and the neural crest: a speculative review. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1399, p. 953–964, 29 jul. 2000.
- ANGST, B. D.; MARCOZZI, C.; MAGEE, A. I. The cadherin superfamily: diversity in form and function. **Journal of cell science**, v. 114, n. Pt 4, p. 629–41, fev. 2001.
- ARMSTRONG, A. J. et al. Circulating Tumor Cells from Patients with Advanced Prostate and Breast Cancer Display Both Epithelial and Mesenchymal Markers. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 8, p. 997–1007, 1 ago. 2011.
- AUNG, P. P. et al. KBA62 and PNL2. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 2, p. 265–272, fev. 2012.
- BALCH, C. M. et al. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 16, p. 3635–3648, 15 ago. 2001.
- BALCH, C. M. et al. Multivariate Analysis of Prognostic Factors Among 2,313 Patients With Stage III Melanoma: Comparison of Nodal Micrometastases Versus Macrometastases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 14, p. 2452–2459, 10 maio 2010.
- BASTIAN, B. C. et al. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. **Cancer research**, v. 58, n. 10, p. 2170–5, 15 maio 1998.
- BERGIN, I. L. et al. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41–53, jan. 2011.
- BERGMAN, P. J. Canine Oral Melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55–60, maio 2007.
- BERGMAN, P. J. Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. (Eds.). **Small Animal Clinical Oncology**. 5. ed. [s.l.: s.n.]. p. 321–334.
- BERX, G.; ROY, F. VAN. The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 5, p. 289–293, 2001.

- BOONE, B. et al. EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 38, n. 6, p. 492–502, jun. 2011.
- BOSTOCK, D. E. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. **Veterinary Pathology**, v. 16, n. 1, p. 32–40, jan. 1979.
- 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, nov. 1970.
- BROCKLEY, L.; COOPER, M.; BENNETT, P. Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 25–31, jan. 2013.
- BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2–11, jan. 2002.
- BURNET, N. G. et al. Years of life lost (YLL) from cancer is an important measure of population burden — and should be considered when allocating research funds. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 2, p. 241–245, 11 jan. 2005.
- BUSAM, K. J. et al. Immunohistochemical analysis of novel monoclonal antibody PNL2 and comparison with other melanocyte differentiation markers. **The American journal of surgical pathology**, v. 29, n. 3, p. 400–6, mar. 2005.
- CARPENTER, G.; COHEN, S. Epidermal Growth Factor. **Annual Review of Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 193–216, jun. 1979.
- CHEN, M. C. et al. Apical EGF receptors regulate epithelial barrier to gastric acid: endogenous TGF- $\alpha$  is an essential facilitator. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 283, n. 5, p. G1098–G1106, nov. 2002.
- 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.
- CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1160–1174, 13 mar. 2008.
- 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. 705–27, mar. 1969.
- CLARK, W. H. et al. A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147–1165, dez. 1984.
- COULIE, P. G. et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 35–42, 1 jul. 1994.
- DE MAZIERE, A. M. et al. The Melanocytic Protein Melan-A/MART-1 Has a Subcellular Localization Distinct from Typical Melanosomal Proteins. **Traffic**, v. 3, n. 9, p. 678–693, set. 2002.
- DENECKER, G. et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 8, p. 1250–1261, 25 ago. 2014.
- DOU, J. et al. Effect of downregulation of ZEB1 on vimentin expression, tumour migration

and tumourigenicity of melanoma B16F10 cells and CSCs. **Cell Biology International**, v. 38, n. 4, p. 452–461, abr. 2014.

DOWNWARD, J. et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. **Nature**, v. 307, n. 5951, p. 521–527, 1984.

ESPLIN, D. G. Survival of Dogs Following Surgical Excision of Histologically Well-differentiated Melanocytic Neoplasms of the Mucous Membranes of the Lips and Oral Cavity. **Veterinary Pathology**, v. 45, n. 6, p. 889–896, nov. 2008.

ETHIER, S. P. Signal transduction pathways: The molecular basis for targeted therapies. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 12, n. 3, p. 3–10, jul. 2002.

FANG, D.; HERLYN, M. The dynamic roles of cell-surface receptors in melanoma development. In: HEARING, V. J.; LEONG, S. P. L. (Eds.). **From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy**. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. p. 169–181.

FORONI, C. et al. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 689–697, out. 2012.

FOTY, R. A.; STEINBERG, M. S. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5–6, p. 397–409, 2004.

FRY, W. H. D. et al. Mechanisms of ErbB receptor negative regulation and relevance in cancer. **Experimental Cell Research**, v. 315, n. 4, p. 697–706, 15 fev. 2009.

FURUKAWA, F. et al. Roles of E- and P-cadherin in the human skin. **Microscopy Research and Technique**, v. 38, n. 4, p. 343–352, 15 ago. 1997.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13–20, 15 jan. 1983.

GERSHENWALD, J. E. et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, p. 472–492, 6 nov. 2017.

GIUDICE, C. et al. Immunohistochemical investigation of PNL2 reactivity of canine melanocytic neoplasms and comparison with Melan A. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 3, p. 389–394, 2010.

GOLDBERG, S. B. et al. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. **The Lancet Oncology**, v. 17, n. 7, p. 976–983, jul. 2016.

GOLDSCHMIDT, M. H. et al. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Classification of Tumors of Domestic Animals**. [s.l.: s.n.]. v. 2p. 38–41.

GORDON-THOMSON, C. et al. ErbB receptors mediate both migratory and proliferative activities in human melanocytes and melanoma cells. **Melanoma research**, v. 15, n. 1, p. 21–8, fev. 2005.

- GORDON-THOMSON, C.; MASON, R. S.; MOORE, G. P. Regulation of epidermal growth factor receptor expression in human melanocytes. **Experimental dermatology**, v. 10, n. 5, p. 321–8, out. 2001.
- GROSS, T. L. et al. Clinical and Histopathological Diagnosis. In: **Skin Diseases of the Dog and Cat**. [s.l.: s.n.]. p. 406–410.
- GROSSE-WILDE, A. et al. Stemness of the hybrid Epithelial/Mesenchymal State in Breast Cancer and Its Association with Poor Survival. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0126522, 28 maio 2015.
- GUAN, X. Cancer metastases: challenges and opportunities. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 402–418, set. 2015.
- HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 10, n. 2, p. 153–163, nov. 2005.
- HAHN, K. A. et al. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 251–256, maio 1994.
- HAN, G. et al. Distinct mechanisms of TGF- $\beta$  1 – mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. **Control**, v. 115, n. 7, 2005.
- HAN, J.-I. et al. Alteration in E-Cadherin/B-Catenin Expression in Canine Melanotic Tumors. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 2, p. 274–280, 2012.
- HAO, L. et al. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 6, p. 1184–1197, jun. 2012.
- HERBST, R. S.; LANGER, C. J. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: The emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. **Seminars in Oncology**, v. 29, n. 1, p. 27–36, fev. 2002.
- HERNANDEZ, B. et al. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 394, 30 jan. 2018.
- HIROBE, T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 462–478, jun. 2011.
- HOLLMÉN, M. et al. Proteolytic processing of ErbB4 in breast cancer. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e39413, 22 jun. 2012.
- HOLZ, C. et al. Epithelial–mesenchymal-transition induced by EGFR activation interferes with cell migration and response to irradiation and cetuximab in head and neck cancer cells. **Radiotherapy and Oncology**, v. 101, n. 1, p. 158–164, out. 2011.
- HSU, M.-Y. et al. E-Cadherin Expression in Melanoma Cells Restores Keratinocyte-Mediated Growth Control and Down-Regulates Expression of Invasion-Related Adhesion Receptors. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1515–1525, maio 2000.
- HSU, M. Y. et al. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 1, n. 2, p. 188–94, abr. 1996.
- HULPIAU, P.; VAN ROY, F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. **The**



**International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 349–369, fev. 2009.

IN 'T HOUT, F. E. M. et al. Prognostic Importance of the Extent of Ulceration in Patients With Clinically Localized Cutaneous Melanoma. **Annals of Surgery**, v. 255, n. 6, p. 1165–1170, jun. 2012.

INCA. **Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

INCA. **Estimativa | 2016 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

INCA. **Câncer Pele - Melanoma**.

JIMBOW, K. et al. Some Aspects Of Melanin Biology: 1950–1975. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 67, n. 1, p. 72–89, jul. 1976.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 1 jun. 2009.

KAUSCH, I. et al. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 105, n. 5, p. 710–716, 10 jul. 2003.

KAWAKAMI, Y. et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 9, p. 3515–3519, 26 abr. 1994.

KIBBI, N.; KLUGER, H.; CHOI, J. N. Melanoma: Clinical Presentations. In: KAUFMAN, H. L.; MEHNERT, J. M. (Eds.). **Melanoma**. Cancer Treatment and Research. Cham: Springer International Publishing, 2016. v. 167p. 107–129.

KIM, H.-J. et al. Constitutively Active Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Causes Transformation and Xenograft Growth of Immortalized Mammary Epithelial Cells and Is Accompanied by an Epithelial-to-Mesenchymal Transition Mediated by NF- $\kappa$ B and Snail. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3165–3175, 15 abr. 2007.

KIM, J. H. et al. Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: Histopathological and immunohistochemical study. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 3, p. 318–322, 2011.

KLUGER, H. M. et al. Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma - a large cohort tissue microarray study. **Melanoma Research**, v. 14, n. 3, p. 207–210, jun. 2004.

KLYMKOWSKY, M. W.; SAVAGNER, P. Epithelial-Mesenchymal Transition. **The American Journal of Pathology**, v. 174, n. 5, p. 1588–1593, maio 2009.

KORABIOWSKA, M. et al. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. **Anticancer research**, v. 20, n. 3A, p. 1781–5, 2000.

KREIZENBECK, G. M. et al. Prognostic Significance of Cadherin-Based Adhesion Molecules in Cutaneous Malignant Melanoma. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 4, p. 949–958, 1 abr. 2008.

KRENGEL, S. et al. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 31, n. 1, p. 1–7, jan. 2004.

- LAPRIE, C. et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 139–147, jun. 2001.
- LEBOIT, P. E. et al. **Pathology & Genetics - Skin Tumours**. [s.l.] IARC, 2006.
- LEE, J. M. et al. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. **The Journal of Cell Biology**, v. 172, n. 7, p. 973–981, 27 mar. 2006.
- LI, D.-M.; FENG, Y.-M. Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 1, p. 7–21, 16 jul. 2011.
- LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. **Cancer research**, v. 61, n. 9, p. 3819–25, 2001.
- LO, H.-W. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression. **Cancer Research**, v. 67, n. 19, p. 9066–9076, 1 out. 2007.
- LODISH, H. et al. Cell-Cell Adhesion and Communication. In: **Molecular Cell Biology**. 4. ed. New York: [s.n.].
- MA, X. et al. Ki67 Proliferation Index as a Histopathological Predictive and Prognostic Parameter of Oral Mucosal Melanoma in Patients without Distant Metastases. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 18, p. 3828–3837, 2017.
- MACKIE, R. M.; HAUSCHILD, A.; EGGERMONT, A. M. M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. **Annals of Oncology**, v. 20, n. suppl 6, p. vi1-vi7, 1 ago. 2009.
- MALHO, P. et al. Investigation of prognostic indicators for human uveal melanoma as biomarkers of canine uveal melanoma metastasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 11, p. 584–593, nov. 2013.
- MANDALÀ, M. et al. Mitotic rate correlates with sentinel lymph node status and outcome in cutaneous melanoma greater than 1 millimeter in thickness: A multi-institutional study of 1524 cases. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 2, p. 264–273.e2, fev. 2016.
- MARINI, G. et al. INTERFERENCE OF PHYSICAL THERAPY INTERVENTION ON THE QUALITY OF LIFE OF WOMEN SUBMITTED TO MASTECTOMY SURGERY OR BREAST-CONSERVING THERAPY. **FIEP BULLETIN**, v. 78, p. 48–51, 2008.
- MARMOR, M. D.; SKARIA, K. B.; YARDEN, Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 58, n. 3, p. 903–913, 1 mar. 2004.
- MATTEI, S. et al. Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. **International Journal of Cancer**, v. 56, n. 6, p. 853–857, 15 mar. 1994.
- MCCLAIN, S. E. et al. Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences. **International Journal of Dermatology**, v. 51, n. 4, p. 420–426, abr. 2012.

- MÉNARD, S. et al. Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 2, p. 150–162, 2000.
- MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 2006.
- MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The Molecular Basis of Canine Melanoma: Pathogenesis and Trends in Diagnosis and Therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 163–174, maio 1999.
- MOREAU, J. F.; WEISSFELD, J. L.; FERRIS, L. K. Characteristics and survival of patients with invasive amelanotic melanoma in the USA. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 408–413, out. 2013.
- MORRIS, L. G. et al. PNL2 melanocytic marker in immunohistochemical evaluation of primary mucosal melanoma of the head and neck. **Head & Neck**, v. 30, n. 6, p. 771–775, jun. 2008.
- MUJOO, K. et al. Regulation of ERBB3/HER3 signaling in cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 21, p. 10222–10236, 15 nov. 2014.
- MULAS, J. M. DE LAS; REYMUNDO, C. Animal models of human breast carcinoma: canine and feline neoplasms. **Revista de Oncología**, v. 2, n. 6, p. 274–281, 2000.
- NARAMURA, M. et al. Therapeutic potential of chimeric and murine anti-(epidermal growth factor receptor) antibodies in a metastasis model for human melanoma. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 37, n. 5, p. 343–9, out. 1993.
- NIELSEN, P. S. et al. Proliferation indices of phosphohistone H3 and Ki67: strong prognostic markers in a consecutive cohort with stage I/II melanoma. **Modern Pathology**, v. 26, n. 3, p. 404–413, 23 mar. 2013.
- NIELSEN, T. O. et al. HER4 and its cytoplasmic isoforms are associated with progression-free survival of malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 24, n. 1, p. 88–91, fev. 2014.
- NISHIMURA, E. K. et al. Regulation of E- and P-Cadherin Expression Correlated with Melanocyte Migration and Diversification. **Developmental Biology**, v. 215, n. 2, p. 155–166, nov. 1999.
- NISHIYA, A. T. et al. Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.
- OHSIE, S. J. et al. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p. 433–444, 2008.
- OMS. WHO - Skin Cancers.**
- OSAWA. Melanocyte stem cells. In: **StemBook**. [s.l: s.n.]. p. 1–23.
- PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147–156, 1 fev. 2008.
- PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415–428, 17 jun. 2007.
- PERRAIS, M. et al. E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth

factor receptor signaling independently of other cell interactions. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 6, p. 2013–25, jun. 2007.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1659–1672, 20 out. 2005.

PISAMAI, S. et al. Gene expression profiles of cell adhesion molecules, matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in canine oral tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 113, p. 94–100, ago. 2017.

PLOWMAN, G. D. et al. Molecular cloning and expression of an additional epidermal growth factor receptor-related gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 13, p. 4905–4909, 1 jul. 1990.

PLOWMAN, G. D. et al. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 5, p. 1746–1750, 1 mar. 1993.

PRICKETT, T. D. et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1127–32, 30 out. 2009.

PRIEST, A. V.; SHAFRAZ, O.; SIVASANKAR, S. Biophysical basis of cadherin mediated cell-cell adhesion. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 10–13, set. 2017.

QIAN, X. et al. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 8, p. 1739–1784, 21 abr. 2004.

RÁKOSY, Z. et al. EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1729–37, 15 out. 2007.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597–608, 26 nov. 2000.

RESCHKE, M. et al. HER3 Is a Determinant for Poor Prognosis in Melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 16, p. 5188–5197, 15 ago. 2008.

RIESE, D. J.; STERN, D. F. Specificity within the EGF family ErbB receptor family signaling network. **Bioessays**, v. 20, n. 1, p. 41–48, 1998.

ROBERT, G. et al. SPARC Represses E-Cadherin and Induces Mesenchymal Transition during Melanoma Development. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7516–7523, 1 ago. 2006.

ROCHAIX, P. et al. PNL2, a New Monoclonal Antibody Directed against a Fixative-Resistant Melanocyte Antigen. **Modern Pathology**, v. 16, n. 5, p. 481–490, maio 2003.

ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340–346, abr. 2012.

SCHATTON, T.; FRANK, M. H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 1, p. 39–55, 18 fev. 2008.

SCHECHTER, A. L. et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature**, v. 312, n. 5994, p. 513–516, 6 dez. 1984.

SCHULTHEISS, P. C. Histologic Features and Clinical Outcomes of Melanomas of Lip, Haired Skin, and Nail Bed Locations of Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 4, p. 422–425, 25 jul. 2006.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, v. 36, n. 3, p. 256–263, maio 2000.

SEAMAN, M. N. J.; BURD, C. G.; EMR, S. D. Receptor signaling and the regulation of endocytic membrane transport. **Current Opinion In Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 549–556, 1996.

SHAPIRO, L. et al. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. **Nature**, v. 374, n. 6520, p. 327–337, 23 mar. 1995.

SHAW, J. H. F.; KOEA, J. B. Acral (volar-subungual) melanoma in Auckland, New Zealand. **British Journal of Surgery**, v. 75, n. 1, p. 69–72, jan. 1988.

SHI, F. et al. ErbB3/HER3 intracellular domain is competent to bind ATP and catalyze autophosphorylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 17, p. 7692–7697, 27 abr. 2010.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial–mesenchymal transitions in early development. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 11, p. 1351–1383, nov. 2003.

SIGURDSSON, V. et al. Endothelial Induced EMT in Breast Epithelial Cells with Stem Cell Properties. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e23833, 6 set. 2011.

SILVA, K. L. F. **Estudo da proliferação celular em tumores melanocíticos caninos**. [s.l.] UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO, 2013.

SIMPSON, R. M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 37–47, jan. 2014.

SLAMON, D. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177–182, 9 jan. 1987.

SLIWKOWSKI, M. X. et al. Coexpression of erbB2 and erbB3 Proteins Reconstitutes a High Affinity Receptor for Heregulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14661–14665, 1994.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1155–1228, out. 2004.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic Markers for Canine Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54–72, 25 jan. 2011.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 651–678, 26 nov. 2002.

SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, n. 3, p. 162–172, set. 2009.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 136–

149, 2006.

SRIVASTAVA, A. et al. Immunohistochemical expression of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumors. **Human Pathology**, v. 32, n. 11, p. 1184–1189, nov. 2001.

STEEL, K. P.; DAVIDSON, D. R.; JACKSON, I. J. TRP-2/DT, a new early melanoblast marker, shows that steel growth factor (c-kit ligand) is a survival factor. **Development**, v. 115, n. 4, p. 1111–9, ago. 1992.

TEIXEIRA, T. F. et al. Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 3, n. 2, p. 100–104, 2010.

TEPASS, U. et al. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 2, p. 91–100, 1 nov. 2000.

THIERY, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 6, p. 442–454, jun. 2002.

THOMAS, C. et al. ER $\beta$ 1 represses basal-like breast cancer epithelial to mesenchymal transition by destabilizing EGFR. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. R148, 16 dez. 2012.

THOMAS, N. E. et al. Comparison of Clinicopathologic Features and Survival of Histopathologically Amelanotic and Pigmented Melanomas. **JAMA Dermatology**, v. 150, n. 12, p. 1306, 1 dez. 2014.

THOMPSON, J. F. et al. Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 16, p. 2199–2205, jun. 2011.

TUCCI, M. G. et al. Involvement of E-cadherin,  $\beta$ -catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 6, p. 1212–1216, dez. 2007.

TUCKER, R. P. Neural crest cells: a model for invasive behavior. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 2, p. 173–177, fev. 2004.

TWORKOSKI, K. et al. Phosphoproteomic Screen Identifies Potential Therapeutic Targets in Melanoma. **Molecular Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 801–812, 1 jun. 2011.

UDART, M. et al. Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases. **Neoplasia**, v. 3, n. 3, p. 245–54, 2001.

WANDLER, A. et al. Automated quantification of Ki67/MART1 stains may prevent false-negative melanoma diagnoses. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 43, n. 11, p. 956–962, nov. 2016.

WANG, Y.; ZHOU, B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. **Chinese Journal of Cancer**, v. 30, n. 9, p. 603–611, 5 set. 2011.

WILEY, H. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. **Experimental Cell Research**, v. 284, n. 1, p. 78–88, 10 mar. 2003.


WILKIE, A. L.; JORDAN, S. A.; JACKSON, I. J. Neural crest progenitors of the melanocyte

lineage: coat colour patterns revisited. **Development**, v. 129, n. 14, p. 3349–57, jul. 2002.

YARDEN, Y.; SLIWKOWSKI, M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 127–137, 1 fev. 2001.

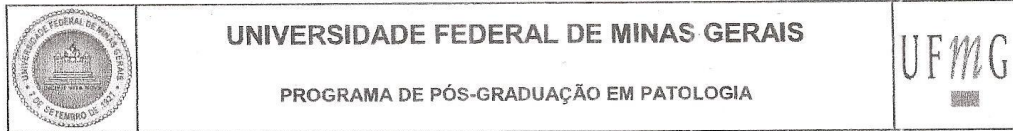
## 11. ANEXO

### 11.1) Certificado de Aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 8 / 2016, relativo ao projeto intitulado “EXPRESSAO GENICA E PROTEICA DE MARCADORES PROGNOSTICOS NOS MELANOMAS CANINOS CUTÂNEOS E ORAL”, que tem como responsável Enio Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 22/03/2016. Este certificado expira-se em 22/03/2021.	
<b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 8 / 2016, related to the Project entitled “GENE AND PROTEIN EXPRESSION OF PROGNOSTIC MARKERS IN SKIN AND ORAL CANINE MELANOMAS”, under the supervision of Enio Ferreira, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 22/03/2016. This certificates expires in 22/03/2021.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador (a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 22/03/2016.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	



## 11.2) Ata de Defesa da Dissertação



### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO EMERSON SOARES VELOSO

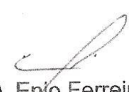
Realizou-se, no dia 27 de fevereiro de 2018, às 14:00 horas, C3241, Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Pampulha-UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Análise da transição epitélio-mesênquima e de receptores de fator de crescimento epidérmico em melanomas cutâneos e de cavidade oral em cães*, apresentada por EMERSON SOARES VELOSO, número de registro 2016662721, graduado no curso de CIENCIAS BIOLOGICAS/DIURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Enio Ferreira - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Helen Lima Del Puerto (UFMG), Prof(a). Istéfani Luciene Dayse da Silva (Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira), Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes (UFMG).

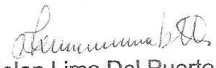
A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

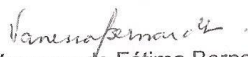
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.

  
Prof(a). Enio Ferreira ( Doutor )

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

  
Prof(a). Istéfani Luciene Dayse da Silva ( Doutora )

  
Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes ( Doutora )