

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Expressão imunohistoquímica da iNOS em
melanomas orais de cães**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Luísa Susete Machado Soares

Orientador: Prof. Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas

Coorientador: Prof^ª. Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires



VILA REAL, 2019

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Expressão imunohistoquímica da iNOS em
melanomas orais de cães**

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Luísa Susete Machado Soares

Orientador: Prof. Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas

Coorientador: Prof^ª. Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires

Composição do Júri:

“A educação é a arma mais poderosa que se pode usar para mudar o mundo.”
Nelson Mandela

“As Doutrinas expostas no presente trabalho
são da exclusiva responsabilidade do autor”

RESUMO

Os tumores melanocíticos podem apresentar um carácter maligno, invasivo e com potencial metastático, e neste contexto, justifica-se o estudo imunohistoquímico da expressão da iNOS (óxido nítrico sintetase) para ampliar o conhecimento do comportamento e do microambiente que envolve estas neoplasias.

A sintetase do óxido nítrico, que catalisa a produção de óxido nítrico, é uma importante molécula envolvida na sinalização celular, e está associada a muitos processos fisiológicos e patológicos como a inflamação e o cancro. A sua deteção nos tecidos é usada como indicador dos níveis de óxido nítrico. Os estudos acerca da importância do óxido nítrico nos tumores são ainda pouco consensuais e por vezes contraditórios. Sendo o melanoma um paradigma para o estudo da imunologia tumoral, os autores efetuaram um estudo retrospectivo com base em quinze melanomas orais provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de São Paulo-Brasil. De cada animal foram registados os dados referentes à identificação (idade, género e raça) e os dados referentes ao tumor (tamanho, localização e presença de metástases) tendo sido feita, posteriormente, uma avaliação das lesões em preparações coradas com hematoxilina-eosina, relativamente aos seguintes parâmetros histopatológicos previamente definidos: atividade juncional; grau de atipia nuclear; tipo celular; infiltrado celular, presença de células gigantes, de células tumorais intravasculares, de ulceração ou necrose; grau de pigmentação celular; estroma e índice mitótico.

A expressão da iNOS foi efetuada pelo método da estreptavidina biotina peroxidase. A execução deste método consiste na incubação do anticorpo primário, seguido de um anticorpo secundário biotinilado e do complexo streptavidina-biotina conjugado com a enzima horseradish peroxidase (HRP). Para cada caso, foram avaliados vários parâmetros histopatológicos, os tumores foram categorizados em dois grupos: 0 – negativos (onde se incluíram os tumores negativos ou com grau 1 de extensão) e 1 – positivos (onde se incluíram os graus 2 e 3, independentemente da intensidade de marcação). O Grau de atipia e o tipo celular associaram-se com expressão de iNOS, com um nível de significância de ($p=0,044$) e ($p=0,047$) respetivamente. Assim, os tumores com atipia moderada são todos negativos para a iNOS. Já a maioria dos tumores com elevada atipia são, em geral, positivos para a iNOS. Em relação ao tipo celular, os tumores de células redondas, dois são positivos, enquanto os tumores com células de morfologia mista são, em geral, negativos para este biomarcador.

Palavras-chaves: Melanoma, Cães, Imunohistoquímica, iNOS.

ABSTRAT

Melanocytic tumors appear malignant, invasive and potentially metastatic in character; in this context, the immunohistochemical study of the aspect of iNOS (nitric oxide synthetase) is justified in order to expand our knowledge of the behavior and the microenvironment that surrounds these neoplasms.

Nitric oxide synthetase, which catalyzes the production of nitric oxide, is an important molecule involved in cell signaling, and is associated with many physiological and pathological processes such as inflammation and cancer. Its detection in tissues is used as an indicator of nitric oxide levels. Studies of the importance of nitric oxide in tumors are still not very consensual and are often contradictory. Since melanoma is a paradigm for the study of tumor immunology, the authors performed a retrospective study based on fifteen oral melanomas from the Laboratory of Pathological Anatomy of the University of São Paulo-Brasil.

Data from each animal was recorded including identifying markers (age, gender, and breed), and tumor data (size, location, and presence of metastases). An evaluation of the lesions was performed using hematoxylin-eosin stained preparations with respect to the following previously defined histopathological parameters: junctional activity, degree of nuclear atypia, cell type, cellular infiltrate, and presence of giant cells, intravascular tumor cells, ulceration or necrosis, degree of cellular pigmentation, stroma, and mitotic index.

The aspect of iNOS was effected by the streptavidin biotin peroxidase method. This method is performed by incubating the primary antibody, followed by a biotinylated secondary antibody and the horseradish peroxidase (HRP) conjugated streptavidin-biotin complex. For each case, several histopathological parameters were evaluated; tumors were categorized into two groups: 0 - negative (where negative tumors were included or 1 degree - positive tumors) and 1 - positive tumors (including degrees 2 and 3, irrespective of the degree of labeling). The degree of atypia and the cell type were statistically significant, with a significance level of ($p = 0.044$) and ($p = 0.047$) respectively. The authors found that tumors with moderate atypia are all negative for iNOS, but most tumors with high atypia are positive for iNOS. With regard to the cell type; in tumors with round cells, two are positive, while tumors with cells of mixed morphology are generally negative for this biomarker.

Keywords: Melanoma, Dogs, Immunohistochemistry, iNOS.

ÍNDICE GERAL

Resumo	iii
<i>Abstract</i>	iv
Índice Geral	v
Índice de figuras	vi
Índice de quadros	vii
Siglas e abreviaturas	viii
Agradecimentos	ix

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução.....	1
2. Neoplasias da Cavidade Oral.....	3
3. Distinção entre Neoplasias Não Odontogénicas e Odontogénicas	
I.Tumores não odontogénicos.....	4
II.Tumores odontogénicos.....	4
4.Tumores melanocíticos.....	6
5. Melanomas Oraís	
I.Orígem celular.....	7
II.Formação da Melanina.....	8
III.Etiologia.....	8
IV.Epidemiologia.....	9
6. Metastização Tumoral.....	11
7. Sinais clínicos e Diagnóstico.....	12
7.1. Análise histopatológica.....	13
7.2. Análise imunohistoquímica.....	15
7.3. Principais anticorpos e proteínas relacionadas com o melanoma.....	16
I.Ki67.....	17
II.Proteína S100.....	18
III.HMB-45.....	19
IV.Melan-A.....	19
V.Tirosinase.....	19
VI.P53.....	20
VII.COX1 COX2.....	20
VIII. iNOS.....	21
7.4. Imagiologia.....	21
8. Estadiamento Tumoral.....	22

9. Tratamento.....	24
10. Prognóstico.....	29
11. Objetivos do trabalho.....	30
12. Material e Métodos	31
12.1. Avaliação clínica.....	31
12.2. Estudo histopatológico.....	32
13. Estudo imunohistoquímico	33
13.1. Quantificação da imunoreatividade.....	34
14. Análise estatística	34
15. Resultados.....	36
15.1. Avaliação clínica.....	36
15.2. Localização e Raça.....	36
15.3. Idade.....	37
15.4. Tamanho.....	38
15.5. Metástases.....	38
15.6. Avaliação histopatológica.....	43
15.6. Expressão imunohistoquímica da iNOS.....	44
15.7. Associação imunoexpressão da iNOS com as características histopatológicas.....	46
16. Discussão.....	49
17. Conclusão.....	54
18. Anexos.....	55
19. Bibliografia.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Melanoma pigmentado uveal unilateral.....	10
Figura 2: Melanocitoma cutâneo.....	10
Figura 3: Melanoma maligno oral.....	55
Figura 4: Melanoma maligno com localização tonsilar.....	55
Figura 5: Melanoma com localização maxilar.....	55
Figura 6: Melanoma oral com atividade juncional e proliferação intraepitelial.....	39
Figura 7: Melanoma oral com moderada atipia nuclear (grau 2).....	39
Figura 8: Melanoma oral com acentuada atipia nuclear (grau 3).....	40
Figura 9: Melanoma oral com infiltração linfoplasmocitária.....	41
Figura 10: Melanoma oral amelanico observando-se presença de células tumorais intravasculares.....	42
Figura 11: Imunorreatividade para a iNOS em melanoma oral.....	45

Figura 12: Imunorreatividade para o iNOS em melanoma oral (400x).....	45
Figura 12: Imunorreatividade para o iNOS em melanoma oral (600x).....	46

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Tumores da cavidade oral em cães e a sua localização.....	3
Quadro 2: Tumores da cavidade oral de origem não-odontogénica.....	4
Quadro 3: Tumores da cavidade oral de origem odontogénica.....	5
Quadro 4: Estadiamento clínico para neoplasia oral em cães e gato.....	23
Quadro 5: Estadiamento clínico melanoma oral cão.....	23
Quadro 6: Distribuição da raça.....	36
Quadro 7: Distribuição com a localização.....	36
Quadro 8: Características histopatológicas.....	43
Quadro 9: Relação entre a intensidade e extensão.....	44
Quadro 10. Associação entre imunexpressão iNOS e as características histopatológicas.....	46

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico das raças.....	37
Gráfico 2: Histograma da idade em cães.....	37
Gráfico 3: Distribuição dos melanomas caninos por tamanho da lesão	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides

ANOVA - Análise de variância

COX 1 - Ciclo oxigenase 1

COX-2 - Ciclo oxigenase 2

CTI - Células Tumorais Intravasculares

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

HE- Hematoxilina-Eosina

IHQ - Imunohistoquímica

IM - Índice mitótico

iNOS - Oxido nítrico sintetase

KMnO₄ - Permanganato de potássio

M – Melanoma

MO- Melanoma Oral

NO - Oxido nítrico

OMS - Organização Mundial de Saúde

p - Significância estatística

PBS - Tampão fosfato salino

perivasculares

PGE2 – Prostaglandina

r - Coeficiente de correlação

RM - Ressonância Magnética

RE - Retículo Endoplasmático

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

std.- Desvio padrão

SRD - Sem raça determinada

TNM - Tumor, Linfonodos, Metástases

TIL - Tumor infiltrating lymphocytes

TC -Tomografia Computorizada

UTAD - Universidade de Trás-os-

Montes e Alto Douro

UV- Ultravioleta

χ^2 - Teste Qui-quadrado

AGRADECIMENTO

Ao concluir esta dissertação de mestrado não podia deixar de expressar o meu agradecimento a um conjunto de pessoas que tornaram possível a sua realização:

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas, sempre prestável em qualquer situação. Agradeço-lhe o voto de confiança depositado, em ter permitido a realização desta dissertação, pelo seu apoio e força em todas as situações e, principalmente pela paciência em me orientar, em qualquer dúvida que me foi aparecendo ao longo do meu percurso académico e mesmo durante a dissertação. A sua paixão e profissionalismo e à dedicação em ensinar, e particularmente na Odontologia, terão sido a minha maior motivação.

À Professora Doutora Isabel Cristina Ribeiro Pires, pela competência com que orientou esta minha tese e o tempo que generosamente me dedicou, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos com paciência, compreensão, confiança e bondade.

Ao Professor Doutor Marco Gioso, pela atenção e amabilidade de me receber na sua cidade São Paulo-Brasil, por todos os ensinamentos pessoais e profissionais e pelas oportunidades que me ofereceu, na orientação do meu estágio.

À Doutora Tatiana Pavan, pelo ensinamento, profissionalismo, disponibilidade e amabilidade prestada.

À Universidade de São Paulo, principalmente ao departamento de odontologia comparada, a todos os profissionais lá presentes.

Ao hospital veterinário da UTAD, a todos os profissionais, todo o carinho, e ensinamentos com que me receberam durante o meu estágio.

Na generalidade, agradeço a todos os professores que tudo me ensinaram com paciência e exigência e que contribuíram para a minha formação pessoal e académica.

Ao Hospital Veterinário de Gaia, a toda a equipa, por tudo, vocês sabem.

Ao Dr. Sérgio Alves do Hospital Veterinário de Gaia, pela oportunidade, por acreditar em mim. Serei eternamente grata. Um obrigado especial.

Aos meus amigos que me acompanharam durante todo o percurso acadêmico, um muito obrigado pelo apoio durante a realização deste trabalho, e companheirismo nesta jornada universitária.

Aos meus pais, Vicente Soares, Maria Neves, por todos os sacrifícios que fizeram para meu benefício, por todo o apoio e amor, sem eles nada disso seria possível.

A toda minha família, por todo apoio, carinho e paciência, que sempre manifestaram, nos bons e maus momentos da minha vida.

Um agradecimento especial à avó Linda, pelas palavras de amor, e força e por sempre acreditar em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Estas sempre no meu coração e no meu pensamento.

Por fim agradeço a todos os que tornaram, direta e indiretamente, possível a execução deste trabalho.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

Revisão bibliográfica

1. Introdução

Os tumores malignos caracterizam-se por um crescimento celular descontrolado, com capacidade de invasão local e de metastização em diferentes regiões do organismo, podendo causar graves consequências para a saúde ou mesmo conduzir à morte (World Health Organization, 2016).

Os registos oncológicos fornecem dados que possibilitam a realização de estudos epidemiológicos, permitindo o cálculo da incidência, a identificação de fatores de risco, e o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controlo, assim como de tratamento (Brønden *et al.*, 2009; Graf *et al.*, 2015; Vascellari *et al.*, 2009).

O melanoma representa uma das mais frequentes causas de morte no homem, e nos animais de companhia (Graf *et al.*, 2015; Vascellari *et al.*, 2009;), contudo nestes animais tem sido difícil de determinar a morbilidade e a mortalidade associadas à presença do mesmo (Vascellari *et al.*, 2009).

Os melanomas orais, presentes sobretudo nos lábios, gengiva, língua e palato duro, representam cerca de 5% de todos os tumores presentes no cão, e mais em particular 30% a 40% dos tumores malignos da cavidade oral nesta espécie (Bergman, Kent, & Farese, 2012; Coyle e Garret., 2009; Fonseca *et al.*, 2014).

Alguns autores sugerem uma componente hereditária para o desenvolvimento ou progressão desta neoplasia. Existe assim, uma maior prevalência em determinadas raças puras, assim como, um risco acrescido em cães com a mucosa oral pigmentada. (Dennis *et al.*, 2006; Modiano *et al.*, 1999; Kitchel e Sulaimon, 2003; Ramos-Vara *et al.*, 2000).

O melanoma em cães é uma neoplasia com um comportamento biológico muito variável, existindo vários estudos que definem marcadores de prognóstico para esta neoplasia, mas poucos são os que os avaliam. Para além disso, não existe um critério universalmente aceite pela comunidade científica no que diz respeito aos critérios de prognóstico para estes tumores, complicando assim as conclusões que se poderiam tirar dos poucos estudos que existem (Smedley, Spangler, *et al.*, 2011).

Em geral, os machos são mais afetados que as fêmeas, e a maioria dos casos atinge animais, de meia-idade, ou de idade avançada, ainda que uma percentagem mínima ocorra em animais mais jovens. (Henry e Higginbotham, 2010; Liptak e Withrow., 2007 White, 2003a).

O fato destes animais domésticos, em particular, terem um curto tempo de vida, determina uma rápida progressão das neoplasias, o que associado à circunstância de

existirem diversas semelhanças anatómicas, biológicas, histopatológicas, genéticas e moleculares com as neoplasias do Homem, faz com que, o cão e o gato, sejam muitas vezes utilizados, como modelos animais, em estudos experimentais, com vista à obtenção de informação e à sua translação para a medicina humana (Bertone *et al.*, 2003; DiBernardi *et al.*, 2007; MacEwen, 1990; Hansen e Khanna, 2004; Vail e MacEwen, 2000).

Em 1987, demonstrou-se que as células dos mamíferos, macrófagos e células endoteliais, possuem a capacidade de sintetizar óxido nítrico (ON), ou monóxido de azoto, tornando a molécula interessante para a comunidade científica (Vallance e Collier, 1999).

O óxido nítrico, é um radical livre de oxigénio, que é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, através de um processo catalisado, pela enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) (Buttery *et al.*, 1993).

O óxido nítrico é uma molécula com efeitos pleiotrópicos, altamente reativa e com um tempo de semivida reduzido, que tem vindo a revelar ter um papel crucial em vários processos biológicos (Vallance e Collier., 1999). Os efeitos biológicos do ON, de forma simplificada, podem ser divididos em diretos e indiretos, assumindo-se como fatores determinantes no seu efeito biológico, a concentração e a fonte do ON (Fukumaru *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014). Quando em baixa concentração, é libertado por curtos períodos de tempo, mediando principalmente efeitos diretos, enquanto os efeitos indiretos ocorrem na presença de elevadas concentrações de ON mantidas por longos períodos de tempo (Espey *et al.*, 2002).

Entretanto, o papel modulador da iNOS e conseqüentemente do óxido nítrico, gerado a partir da ativação da enzima, em processos associados à progressão tumoral como a transformação maligna, angiogénese e metástase, ainda não é devidamente compreendido mas suspeita-se da sua particular importância na neovascularização, o que contribui, para a manutenção do fluxo sanguíneo adequado para o tumor (Buttery *et al.*, 1993). Vários estudos sugerem que a importância do óxido nítrico na progressão tumoral está associada à S-nitrosilação de resíduos de cisteína em proteínas participantes de vias de sinalização celular. (Batista *et al.*, 2012; Switzer *et al.*, 2012; Wang, 2012).

Assim ações inibidoras ou estimulantes do desenvolvimento de tumores orais, como sejam os melanomas, podem ocorrer no microambiente tumoral, na dependência dos níveis de expressão da iNOS, e conseqüente produção de óxido nítrico, no microambiente tumoral. (Switzer *et al.*, 2012; Wang, 2000).

Estudos desenvolvidos, em Melanomas humanos, apontam este marcador como tendo valor preditivo no desenvolvimento da metastização à distância. (Wang, 2000).

Temos presente um estudo, acerca da expressão das iNOS em melanomas orais no cão. No entanto, este estudo não inclui outras variáveis histopatológicas para além do índice mitótico, nem estudos de seguimento clínico. (Green *et al.*, 2013).

2. Neoplasias da Cavidade Oral

Os locais mais frequentemente afetados por tumores da cavidade oral são a gengiva, a mucosa oral e labial, a língua, as amígdalas o palato mole ou duro e os alvéolos dentários (Freeman, Hahn, Harris & King, 2003) Ver Quadro 1.

Quadro 1 - Tumores da cavidade oral em cães

Gengiva e arcada dentária	
Benignos	Malignos
Papilomas Ameloblastoma acantomatoso Odontoma Ameloblastoma Melanocitoma Plasmocitoma	Carcinoma Espinocelular Tumores Melanocíticos Fibrossarcoma Linfoma Epiteliotrópico Carcinoma das células basais
Mandíbula e Maxila	
	Osteossarcoma Fibrossarcoma
Língua	
	Carcinoma Espinocelular Rabdomiossarcoma Melanoma Mioblastoma
Tonsila palatina	
	Carcinoma espinocelular Linfoma Melanoma
Glândulas salivares	
Tumor benigno, misto da glândula salivar	Adenocarcinoma
Vestíbulo oral e lábios	
	Carcinoma espinocelular Mastocitoma Melanoma Linfoma epiteliotrópico

Adaptado de Bhang, 2006; Brockus *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2002; Spangler *et al.*, 2006.

3. Distinção entre Neoplasias Não Odontogénicas e Odontogénicas

I. Tumores não-odontogénicos

Estes surgem de vários tecidos da cavidade oral que não os tecidos dentários, sendo na sua maioria malignos (Bellows *et al.*, 2004; Birchard *et al.*, 1996;). Ver quadro 2.

Quadro 2 - Tumores da cavidade oral de origem não-odontogénica

Tumores benignos		
Adenoma	Histiocitoma	Melanocitoma
Condroma	Linfangioma	Mioblastoma
Fibroma	Lipoma	Papiloma vírico
Hemangioma	Osteoma	Plasmocitoma

Tumores malignos		
Adenocarcinoma	Hemangiopericitoma ma-	Osteossarcoma
Angiofibrossarcoma	ligno	Plasmocitoma
Carcinoma das células basais	Hemangiossarcoma	Rabdomiossarcoma
Carcinoma espinocelular	Leiomiossarcoma	Sarcoma epiteloide
Carcinoma indiferenciado	Linfoma	Sarcoma indiferenciado
Carcinoma tiroideo ectópico	Mastocitoma	Schwanoma
Condrossarcoma	Melanoma	Tumor das células neuro-
Fibrohistiocitoma maligno	Mioblastoma	endócrinas
Fibrossarcoma	Neurofibrossarcoma	Tumor venéreo
		transmissível

Adaptado de Bhang, 2006; Birchard, 1996; Brockus *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2003; Howard, 2002; Marretta, 2001; Owen *et al.*, 2006; Rodríguez-Quirós *et al.*, 1998; Smith, 2005; Tholen *et al.*, 1989; White, 2003; Verhaert, 2001.

II. Tumores odontogénicos

O primeiro autor a descrever estes tumores que têm origem em estruturas dentárias (Rodríguez-Quirós *et al.*, 1998), pelo nome de *odontoma* foi Pierre-Paul Broca, em 1866 (Gorlin *et al.*, 1960). Os tumores odontogénicos são lesões derivadas dos tecidos que dão origem aos tecidos dentais ou remanescentes dos mesmos (Mosqueda-Taylor, 2008).

Tradicionalmente eram classificados quanto à presença ou ausência do fenômeno de indução, que não é mais do que a interação entre os tecidos epiteliais e os tecidos mesenquimatosos durante a odontogênese (Verstraete,1995;Verstraete, 2003a). Apesar de serem raros, o conhecimento destes tumores é importante na elaboração das listas de diagnósticos diferenciais (Ferro *et al.*, 2004). Ver quadro 3.

Quadro 3- Tumores da cavidade oral de origem odontogénica

Tumores benignos	
Odontogênicos epiteliais	
Ameloblastoma	Fibroma ameloblástico
Ameloblastoma unicístico	Fibroma ameloblástico
Ameloblastoma extraósseo/periférico	Odontoma composto
Tumor odontogênico escamoso	Odontoma complexo
Tumor odontogênico epitelial calcificante	Tumor dentinogênico de células fantasmas
Tumor odontogênico adenomatoide	Tumor odontogênico primordial
Mesenquimais /Ectomesenquimais	
Fibroma odontogênico	
Mixoma odontogênico/Mixofibroma	
Cementoblastoma	
Fibroma cimento-ossificante	
Quistos Odontogênicos de desenvolvimento	
Quistos dentígeros	
Quistos radiculares	
Quisto periodontal lateral	
Quisto gengival	
Quisto odontogênico glandular	
Quisto odontogênico ortoqueratinizado	
Tumores malignos	
Carcinoma ameloblástico	
Carcinoma intraósseo primário	
Carcinoma odontogênico esclerosante	
Carcinoma odontogênico de células claras	
Carcinoma odontogênico de células fantasmas	
Carcinossarcoma odontogênico	
Sarcomas odontogênicos	

Adaptado de: Wright e Vered2, 2017.

4. Tumores Melanocíticos

Os tumores melanocíticos são conhecidos desde a antiguidade, tendo sido designados por Celsius, de "melas", devido à sua cor negra. Em 1806, Laennec introduziu o termo "melanose" para descrever a doença pigmentada da pele. Em 1837, Carswell propôs o termo melanoma, para designar os tumores melanocíticos malignos (Baba *et al.*, 2007), sendo que o primeiro relato de melanoma em cães foi descrito por Burkner, no ano de 1882 (Ferreira *et al.*, 1997).

As neoplasias melanocíticas no cão podem ser benignas (melanocitomas) ou malignas (melanomas) Por sua vez, os melanomas podem ser classificados de acordo com a intensidade de pigmentação em melanomas amelanóticos e melanóticos (Nishiya *et al.*, 2016; Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

Os tumores melanocíticos estão descritos no homem e na maioria dos animais domésticos, incluindo cães, gatos, cavalos, selvagens terrestres, e marinhos (Sweet *et al.*, 2012). Contudo, no caso particular da cavidade oral, o melanoma é o tumor maligno mais diagnosticado no cão (Bergman, Kent & Farese, 2013; Kirpensteijn & Boston, 2016).

Em todos os vertebrados, a pele é originada a partir de um tegumento embrionário primário, composto inicialmente por células da epiderme primitiva. Posteriormente ocorre a condensação de células mesenquimais, localizadas abaixo da epiderme e a pele primitiva passa a ser composta por duas camadas, a epiderme primitiva que dá origem à epiderme, e a camada mesenquimal que dá origem à derme (Perrone, 2001). Na epiderme é possível destacar quatro tipos de células: queratinócitos (85% das células observadas na pele); células de Langerhans (3 a 8%), células de Merckel (2%) e melanócitos (5%) (Muller *et al.*, 2001). Embora a maioria dos melanomas ocorra na pele, estes podem desenvolver-se em qualquer outro local onde subsistem melanócitos. A maior parte da melanina é encontrada na camada basal da epiderme, porém, em cães de pele escura este pigmento pode ser encontrado em todas as camadas da epiderme (Muller *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, o aumento da incidência dos casos de melanomas em cães tem motivado cada vez mais o estudo do seu perfil, onde muitas variáveis intrínsecas ao tumor, parecem influenciar a sobrevivência do animal (Ferreira *et al.*, 1997).

5. Melanomas orais

I. Origem Celular

Os tumores melanocíticos são formados a partir de melanoblastos e de melanócitos.

Os melanoblastos têm origem neuroectodermal (Goldschmidt; Hendrick., 2002), ou seja, tem origem, na crista neural do embrião. Estas células são encontradas nas camadas basal e espinhosa da epiderme (Camargo *et al.*, 2008, Kemper *et al.*, 2012) pois, durante o desenvolvimento fetal, migram para a pele e folículos pilosos (Goldschmidt; Hendrick., 2002).

Os melanócitos são células dendríticas derivadas dos melanoblastos neuroectodermais e da crista neural que migram durante a embriogênese para a epiderme, derme, membranas mucosas e olhos (Withrow, Vail, & Page, 2012). Morfologicamente são compostos por um citoplasma pálido e abundante, com quantidades variáveis de pigmento, núcleos grandes pleomórficos e nucléolos proeminentes, sendo a sua principal função a síntese de melanina, pigmento que confere cor aos pelos, pele e cabelos e protege a pele contra os raios solares (Teixeira *et al.*, 2010).

Os melanócitos são células estáveis que sob condições normais de homeostasia permanecem quiescentes, proliferam, diferenciam-se ou sofrem apoptose (Haass *et al.*, 2005). Qualquer alteração conducente à quebra das suas junções com os queratinócitos, pode iniciar o desenvolvimento de uma neoplasia, devido a um crescimento celular descontrolado (Withrow & Vail., 2007).

Para cada melanócito existem cinco queratinócitos ao seu redor (Hsu, May Yu *et al.*, 2000, Haass *et al.*, 2005), e esta interação é mediada por dendrites que partem dos melanócitos e se estendem para dentro da epiderme estabelecendo a comunicação. Os melanócitos não estabelecem contato entre si, mas formam junções aderentes com queratinócitos vizinhos, através de moléculas de adesão, tais como a caderina-e, a desmoglina, e de canais de comunicação tipo *gap* (as conexinas) (Li *et al.*, 2002).

II. Formação da melanina

A maior parte da melanina encontra-se essencialmente na camada basal da epiderme, mas em cães de pele escura, este pigmento pode encontrar-se, em todas as camadas da epiderme (Muller *et al.*, 2001).

A melanogénese, ocorre no interior dos melanócitos, a partir da tirosina e é desencadeada através da atividade da enzima tirosinase (Benett,1993). O retículo endoplasmático sintetiza a tirosina, que se acumula nos melanosomas, vesículas formadas pelo complexo de Golgi (Popowski,1997). A síntese de melanina tem início pela hidroxilação da tirosina à 3,4 diidroxifenilalanina (DOPA), e conseguinte a dopaquinona. Estas duas etapas são catalisadas pela tirosinase. Formada a dopaquinona ocorrem várias reações complexas, catalisadas por outras enzimas, que envolvem ciclizações e polimerizações oxidativas que por fim resultam na eu- ou feomelanina. (Thody & Shuster,1989).

Os melanosomas tornam-se maduros pela acumulação de melanina, e com esta ação perdem atividade tirosinásica, adquirindo o nome de grânulos de melanina. Uma vez formados, estes grânulos migram através de prolongamentos ou dendrites dos melanócitos sendo transferidos para o interior dos queratinócitos, células epiteliais que rodeiam os melanócitos, processo denominado por citocronia (Goldschmidt & Goldschmidt, 2016).

O controlo da sua regulação e proliferação é realizado pelos queratinócitos, através de vias parácrinas, comunicações intracelulares (via segundo mensageiro) e intercelulares (via moléculas de adesão e conexinas). (Thody & Shuster,1989).

III. Etiologia

Na medicina humana as neoplasias melanocíticas foram identificadas na antiguidade em indivíduos mumificados que viveram há mais de 2000 anos.

Ainda assim, não existe consenso internacional quanto à etiologia desta neoplasia em medicina veterinária (McManus, Smith, & Goldschmidt, 2002).

Diversos fatores etiológicos parecem estar correlacionados com o aparecimento desta neoplasia em cães, incluindo a consanguinidade, traumas, exposição a químicos, hormonas e suscetibilidade genética (Modiano, Ritt, & Wojcieszyn, 1999).

As modificações genéticas e epigenéticas nos melanócitos, que levam a alterações na expressão e função dos genes e proteínas envolvidos no ciclo do controlo celular e apoptose, estão certamente envolvidas no desenvolvimento de melanomas (Nishiya *et al.*, 2016).

Em humanos, 65% dos melanomas estão diretamente relacionados com uma mutação genética, e surgem após uma exposição prolongada à radiação solar dos raios UVA e UVB (Smith *et al.*, 2002).

IV. Epidemiologia

Os melanomas orais são mais frequentes em cães do sexo masculino, os quais têm 2,4 vezes mais risco de desenvolver este tipo de neoplasias do que as fêmeas (Liptak & Withrow, 2013).

As raças mais predispostas para o desenvolvimento destas neoplasias são, Cocker Spaniel e Golden Retriever, verificando-se nestas duas raças uma maior prevalência de melanoma maligno labial, em comparação com as restantes, Boston Terrier, Boxer, Chihuahua, Chow Chow, Dachsund, Gordon Setter, Caniche, Caniche miniatura, Pastor Alemão e Scottish Terrier (Liptak & Withrow, 2013; MacEwen *et al.*, 1999; Nishiya *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2002).

A maioria dos cães que desenvolve a doença apresenta idade superior a 8 anos, mas a faixa etária pode variar entre 1 a 17 anos. (Smith *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2010).

No entanto, e apesar de poder apresentar várias localizações na cavidade oral, a gengiva (Ramos-Vara *et al.*, 2000) (ver figura 3 em anexo), o palato duro (Alexander *et al.*, 2006), tonsila, (ver figura 4 em anexo), e a língua são os locais mais afetados. Os lábios, apresentam menor incidência (Bergman *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2002).

Relativamente aos Melanocitomas (benigno), tem origem na região da epiderme e anexos e são subclassificados em: dérmicos, intraepidérmicos e compostos. Entre os melanocitomas mais raros, destacam-se, o melanocitoma das células balonizantes, composto por células redondas gigantes, e o melanoacantoma, tumores que apresentam características de uma neoplasia benigna (Goldschmidt *et al.*, 1998). Estes aparecem sobretudo, a nível da cabeça; olho, tronco, escroto, axilas e membros posteriores (Garma-Avina *et al.*, 1981).

De acordo com o tipo da morfologia celular e localização, os tumores melanocíticos, são divididos em subgrupos conforme as células tumorais predominantes (células redondas, fusiformes, poligonais, dendríticas, epitelioides e balonizantes) (Gross *et al.*, 2005).

Estas neoplasias apresentam-se, como nódulos solitários, circunscritos e não encapsulados. São, por norma, bem definidas, intensamente pigmentadas, e não ulcerados (Gross *et al.*, 2005; Withrow & Vail, 2007).

Geralmente manifestam-se como nódulos solitários, com coloração escura (Ginn *et al.*, 2007) (Ver figura 1). São, por norma, bem definidas, intensamente pigmentadas, com consistência firme e sem adesão aos tecidos subjacentes (Withrow & Vail, 2007). A ulceração está ausente na maioria das lesões (Gross *et al.*, 2005).



Figura 1 - Melanocitoma cutâneo num cão.

Adaptado de: Ontario Veterinary College Jan Hall, Clinical dermatology.

As lesões cutâneas malignas surgem com maior incidência a nível do leito ungueal dos dígitos, sobretudo dos membros posteriores, e nas junções mucocutâneas, em especial nos lábios e pálpebras (Gross *et al.*, 2005; Withrow & Vail, 2007).

No caso dos melanomas oculares, a úvea anterior é o local mais comum para a sua ocorrência podendo também ocorrer na coróide. (Goldschmidt, 2002; Smith, 2002). Quando localizada na íris, (ver figura 2), os sinais clínicos são o espessamento da mesma e irregularidade da pupila, com alterações secundárias à uveíte tais como hifema, edema de córnea, buftalmia, catarata, e descolamento da retina que conduz à cegueira. (Bussanich *et al.*, 1987). O glaucoma secundário é muito frequente no melanoma uveal (Mould *et al.*, 2002).

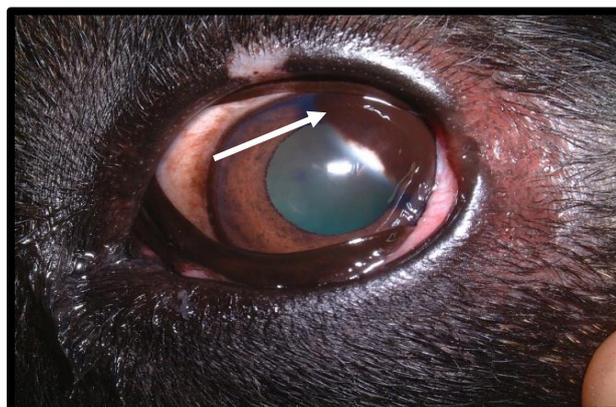


Figura 2 - Cão de raça Labrador do Retriever, apresenta melanoma pigmentado uveal unilateral.
Foto gentilmente cedida pela FMV-ULHT

6. Metastização Tumoral

A doença metastática representa uma das principais causas de morte dos doentes oncológicos, em Medicina Humana e Medicina Veterinária (Argyle, 2003; Kusewitt & Rush, 2007; Mendoza & Khanna, 2009).

A metastização é definida como a disseminação de células neoplásicas para locais distantes e secundários, onde estas proliferam. Implícito a este processo é a presença de um tumor primário (Argyle & Khanna, 2007). No caso do melanoma oral, as vias possíveis de metastização são a hematogénica, a linfática e a transcelómica, tendo como alvo principal os linfonodos e, em seguida, os pulmões. Outros locais que podem ser sede de metastização desta neoplasia são: fígado, cérebro, glândulas adrenais e rins (Smith, *et al.*, 2002; Bergman *et al.*, 2013; Biller *et al.*, 2016).

A patogenia da metastização consiste num conjunto de etapas sequenciais e interrelacionadas, cujo resultado está dependente das propriedades intrínsecas das células tumorais e da resposta do hospedeiro (Argyle & Khanna., 2007).

Processo de metastização:

-Invasão: o processo de invasão requer que a célula neoplásica seja móvel e capaz de digerir a matriz extracelular (Argyle & Khanna., 2007).

-Embolismo/Circulação: as células neoplásicas podem crescer no local de penetração ou podem dissociar-se e circular, sob a forma de células individuais ou pequenos agregados embólicos (Fidler.,1989; Neal & Berry., 2006).

-Transporte: existem três principais vias de metastização - a linfática, a hematogénica e a transcelómica (Cullen *et al.*, 2002).

-Retenção e adesão em tecidos alvos: a retenção dependente da dimensão das células tumorais, no lúmen dos pequenos vasos sanguíneos do órgão-alvo, e a interação mediada por recetores, entre a célula neoplásica e os vasos do hospedeiro (Argyle & Khanna., 2007).

-Extravasão: nesta nova localização, a célula deve sair de circulação, invadir o tecido estranho e sobreviver no microambiente hostil (Argyle & Khanna., 2007).

-Modulação do ambiente: o sucesso da sobrevivência das células neoplásicas requer a modulação do microambiente, através de alterações induzidas pelo tumor no estroma e da produção de fatores de crescimento (Argyle & Khanna., 2007).

-Angiogénese: Novos vasos sanguíneos ou vasos sanguíneos pré-existentes (Argyle & Khanna., 2007).

-Proliferação: As células proliferam e colonizam o tecido secundário (Stafford, Vaidya & Welch., 2008).

A taxa de metastização do MMO é considerada elevada em comparação com outros tumores da cavidade oral. Segundo Braeuer *et al.*, 2013, é devido a várias alterações genéticas e moleculares que ocorrem durante o processo de metastização e que contribuem para o fenótipo maligno destas células tumorais, tais como, as células do melanoma são altamente imunogénicas, isto é, na sua superfície apresentam vários antigénios reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos, e que identificam estas células como tumorais. Possuem mecanismos eficazes de evasão à resposta imunitária do hospedeiro como, por exemplo, a secreção de citocinas inibidoras da resposta imunitária, e também partilham diversos antigénios de superfície com as células do endotélio vascular, os quais ajudam à sua adesão e, posteriormente, migração para locais secundários. São fortemente angiogénicas, e linfangiogénicas, devido à sua produção de moléculas inflamatórias como a interleucina 8, e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). A vitalidade das células-tronco dos melanomas, é superior à de outros tumores, o que intensifica a metastização.

7. Sinais clínicos e Diagnóstico

Os tumores da cavidade oral e da orofaringe, onde se inclui o MO, têm diversas manifestações clínicas, entre as quais: halitose, disfagia, odinofagia, hipersialia, salivação purulenta ou sanguinolenta, mobilidade ou perda dentária, hemorragia oral, edema da face, anorexia e perda de peso (Donald, 2016; Munday *et al.*, 2016). Ocasionalmente, pode haver fraturas patológicas da mandíbula, normalmente associadas a uma extensa destruição do osso subjacente causada pela invasão tumoral do mesmo (Smith *et al.*, 2002). A manifestação de dor oral, normalmente, ocorre nos estádios finais da doença (Requicha, 2010).

Antes da definição exata de um prognóstico, um diagnóstico definitivo deve ser estabelecido (Smedley *et al.*, 2011).

O exame físico deve ser metódico e sistemático, deve compreender, o exame do estado geral, e um exame detalhado, da região oral (Verstraete.,1995).

No exame da cavidade oral, devemos inspecionar a superfície ventral da língua, as gengivas, as arcadas dentárias, as amígdalas, o palato, os lábios e a face (Birchard, 1996; Nelson *et al.*,1992). Na inspeção, devemos avaliar: o tamanho, a localização, a temperatura, a presença de ulceração, hemorragia, infeção ou necrose, o grau de fixação aos tecidos

adjacentes, e a mobilidade dentária (Verhaert, 2001; Verstraete, 2005). Além da avaliação do tumor primário impõe-se, a avaliação dos linfonodos regionais.

A palpação dos linfonodos regionais é imprescindível num exame clínico de qualquer animal (Liptak & Withrow., 2013). Segundo Williams e Packer, 2003, o tamanho dos linfonodos como critério para prever metastização tem uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 51%. Estes autores concluíram que, de facto, existe uma correlação significativa entre o tamanho dos linfonodos e o seu grau de invasibilidade por células tumorais. Contudo, esta associação não aparenta ser forte o suficiente para ser considerada clinicamente relevante. Como tal, a medição do diâmetro dos linfonodos por si só não é suficiente para fazer o estadiamento clínico do MO, podendo ser causa de subdeteção de metástases (Bergman *et al.*, 2013; Williams & Packer., 2003).

No caso dos melanomas, o diagnóstico definitivo geralmente é obtido por avaliação histológica. A histopatologia permite obter o diagnóstico definitivo, além de permitir identificar a neoplasia em questão, permite também determinar o índice mitótico, que é altamente preditivo do grau de malignidade (aproximadamente 90% de precisão) (Withrow & Vail., 2007).

O diagnóstico dos MO é considerado um desafio para o patologista, porque estes apresentam uma grande variação no grau de pigmentação, por vezes podem ser completamente não pigmentados e também apresentar uma enorme variabilidade celular (Ramos-Vara *et al.*, 2000). Outro fator complicado no diagnóstico, é o repertório considerável de aparências microscópicas, pois os melanomas podem assemelhar-se a outros tumores de células redondas como carcinomas, sarcomas, linfomas, plasmocitomas, histiocitomas, leiomiomas, rabiomiomas e Tumor venéreo transmissível (Nishiya *et al.*, 2016).

7.1. Análises histopatológicas

A classificação histológica das neoplasias em benignas e malignas é geralmente associada ao prognóstico e tempo de sobrevivência, mas não é o suficiente, pois em diversas publicações obtemos classificações morfológicas distintas que por si só dificultam a avaliação e previsão final (R. Smedley, 2012).

A biopsia, para além de permitir a obtenção de um diagnóstico histológico, pode também ser útil na determinação da sua diferenciação e capacidade de invasão (Morris & Dobson., 2001; Liptak & Withrow, 2013).

A escolha da técnica depende de alguns fatores tais como a área anatómica na localização da lesão, condição física do animal e suspeita do tipo da neoplasia. As diferentes técnicas utilizadas podem ser: pré tratamento ou incisional, ou pós tratamento ou excisional. (Withrow., 2007). A biopsia incisional é a última etapa na sequência diagnóstica e deve ser

realizada com o animal anestesiado (Liptak *et al.*, 2007). Esta biópsia, está indicada para massas de grandes dimensões, cuja excisão cirúrgica é difícil (Withrow, 2001). A biópsia excisional é um método utilizado quando o tratamento da neoplasia em questão, não é alterado em função do conhecimento do tipo histológico. Fornece informações mais completas sobre a lesão (grau histológico, padrão de invasão celular), (Liptak *et al.*, 2007).

Os tumores da cavidade oral apresentam-se muitas vezes, inflamados, ulcerados, necrosados, ou infetados, sendo por esta razão essencial obter uma amostra grande, profunda e representativa da lesão. A recolha de amostras do centro e dos bordos da lesão aumenta, a sensibilidade do exame (Liptak *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2002).

O mais relevante na avaliação das massas orais, é o estabelecimento do tipo histopatológico (Kafna *et al.*, 2004).

Histologicamente, o melanoma maligno pode apresentar-se como sendo do tipo altamente melanótico ou amelanótico a anaplásico. Os melanócitos anaplásicos formam, com frequência, ninhos na submucosa numa estrutura mista de células epiteliais e fusiformes, juntamente com infiltração juncional entre as células basais e a submucosa. Apresentam-se com citoplasma abundante e, um ou mais núcleos de forma redonda e alongada, e com um nucléolo bastante evidente (Head, Else, & Dubielzig, 2016).

A ulceração define-se como uma solução de continuidade no epitélio que recobre o tumor, com evidência de reação do hospedeiro, para se poder excluir, a que resulta do traumatismo da biópsia. Está demonstrado que a ulceração agrava o prognóstico em inúmeras análises multivariáveis já publicadas (Bergin *et al.*, 2011).

Em termos de previsão de comportamento destas neoplasias, a atipia nuclear e o índice mitótico são os fatores que apresentam um maior valor preditivo.

A atipia nuclear está altamente correlacionada com o prognóstico, independentemente da origem anatómica da neoplasia (Spangler & Kass, 2006).

O índice mitótico expressa-se em baixo, médio e alto, de acordo com o número de mitoses contadas em 10 campos microscópicos (Kesmodel SB, Karakousis GC, Botbyl JD *et al.*, 2005). Quando o número de mitoses é igual ou superior a 6, o risco de metastização é 12 vezes superior em relação a um tumor no qual não se observa qualquer mitose (Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D *et al.*, 1989).

A infiltração e invasão do tumor, quando avaliado, demonstrou estar associado ao tempo de sobrevivência, sendo que uma infiltração profunda do tumor mostrou ser um fator de pior prognóstico (Laprie *et al.*, 2001).

Quanto à presença de inflamação profunda intratumoral ter sido negativamente correlacionada com o tempo de sobrevivência, (Spangler & Kass, 2006) os resultados dos estudos

demonstrados até agora, são contraditórios, tornando difícil qualificar esta característica como fator de prognóstico (Hahn *et al.*, 1994; Millanta *et al.*, 2002; Spangler & Kass, 2006).

7.2. Análise Imunohistoquímica

A imunohistoquímica, é uma técnica que utiliza anticorpos específicos, para a visualização da quantidade, distribuição tecidual e localização celular, de epítomos imunogénicos em cortes histológicos (Haines & West, 2005). É uma técnica importante, por um lado no diagnóstico de tumor melanocítico e, por outro lado, na distinção entre melanocitomas e melanomas. (Smith *et al.*, 2002; Liptak & Withrow, 2013).

Sendo assim a confirmação imunohistoquímica do diagnóstico de melanomas é frequentemente necessária para estabelecer, um plano terapêutico, e emitir um prognóstico (Ramos-Vara *et al.*, 2000 e Smedley *et al.*, 2011b).

Os melanomas apresentam grande variação na sua morfologia microscópica, muitas vezes, imitando os aspetos histológicos de uma grande variedade de tumores incluindo linfomas, e carcinomas pouco diferenciados, tumores neuroendócrinos e sarcomas (Banerjee & Harris., 2000; Ohsie *et al.*, 2008). As células tumorais do melanoma podem apresentar aspeto morfológico variado como epitelióide, fusiforme, plasmocitoide, e de células claras (Banerjee & Harris., 2000; Ohsie *et al.*, 2008). Os padrões de arquitetura incluem espirais, nódulos, rosetas, além de formações glandulares e papilares (Banerjee & Harris., 2000).

Melanomas que apresentam pigmentos de melanina são de fácil diagnóstico, mas nos amelanóticos, a dificuldade no diagnóstico é maior (Yu *et al.*, 2005). As dificuldades de diagnóstico dos tumores melanocíticos também podem estar relacionadas com situações, tais como: dificuldade na distinção entre melanose e melanoma, a não identificação de pequenas áreas de melanoma em sítios de regressão, e presença de micrometástases em linfonodos sentinela (Banerjee & Harris., 2000).

Esta técnica é usada como ferramenta primária para distinguir o melanoma, de outros tumores, e promover o diagnóstico preciso das suas variantes, e na elucidação do prognóstico (Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008). Apesar de alguns melanomas, não necessitarem de imunohistoquímica para o diagnóstico, alguns subtipos já citados requerem essa técnica para um diagnóstico mais acurado e exclusão de possíveis diagnósticos diferenciais como fibrohistiocitoma atípico, carcinoma espinocelular variante de células fusiformes, angiossarcoma ou leiomiiossarcoma (Banerjee & Harris., 2000; Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008).

O mecanismo básico baseia-se no reconhecimento do antígeno por um anticorpo, originando uma reação antígeno-anticorpo. Esta reação é visualizada através de observação microscópica (Looper *et al.*, 2006).

São utilizados anticorpos que identificam moléculas intra ou extras celulares específicas, como proteínas celulares, filamentos, entre outros.

Estas técnicas são utilizadas rotineiramente em medicina humana desde a década de 70, no diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas, e neoplásicas, assim como, no estabelecimento da terapêutica e do prognóstico mais adequados (Ruiz *et al.*, 2005).

Em termos de diagnóstico a IHQ permite a determinação do tipo histológico em tumores indiferenciados ou em metástases de neoplasias primárias ocultas, bem como possibilita a identificação de subtipos histológicos, baseados em painéis de expressão de anticorpos (Ruiz *et al.*, 2005).

O maior entrave à sua utilização reside no facto de os anticorpos de cão e de gato não se encontrarem disponíveis, o que leva a que com frequência, tenha de se recorrer a anticorpos que apresentam, uma reatividade cruzada antígeno humano-antígeno animal. Assim, utilizam-se anticorpos desenhados para antígenos humanos que reconhecem também antígenos animais por analogia da estrutura molecular (Ruiz *et al.*, 2005).

7.2.1. Principais anticorpos e proteínas relacionadas com o Melanoma

Atualmente, o cancro é reconhecido como uma doença de base genética, uma vez que resulta da alteração da expressão ou do funcionamento de genes e proteínas envolvidas no controlo do ciclo celular e da apoptose (Hunter, 1997; Modiano e Ritt, 1999; Sulaimon e Kitchel, 2003). Por sua vez a sobrevivência e o crescimento da célula neoplásica são influenciados pela interação de várias moléculas, estruturas de suporte do estroma, células e mediadores inflamatórios, vasos sanguíneos e linfáticos, alterações da oxigenação tecidual, pressão de fluidos intersticiais, entre outros (Hunter., 1997).

O estudo da cascata de eventos da carcinogénese, desde os mecanismos de ativação e/ou de silenciamento genético até aos que estão direta ou indiretamente envolvidos em fenómenos de proliferação, assim como de crescimento e de invasão tumoral, permitem estabelecer um diagrama de moléculas-chave, com importância e potencial utilidade no diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias (Hunter, 1997; Sulaimon e Kitchel, 2003).

O conhecimento dos fatores genéticos e moleculares, relacionados com o melanoma é fundamental para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos, bem como para a deteção precoce da doença (Polsky *et al.*, 2001). Quanto mais precoce o diagnóstico da neoplasia e o estabelecimento da terapia adequada, maior sucesso no tratamento, e melhor o prognóstico (Polsky *et al.*, 2001).

Os marcadores moleculares, são ferramentas para a melhor compreensão das neoplasias, e podem determinar e identificar o tipo neoplásico. Esses marcadores podem estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, como mutações em genes de predisposição, por exemplo, como também podem estar relacionados, com a expressão de alguns antígenos, em tumores, e com a presença de substâncias específicas na circulação (Figueiredo *et al.*, 2003)

Entre os anticorpos mais citados na literatura para o diagnóstico de melanoma canino, destacamos o HMB-45, proteína S-100 β , Melan-A, Tirosinase, e para marcação de proliferação celular, o Ki-67, e o p53 (Prasad *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008).

I. Ki-67

O marcador de proliferação celular mais usado em patologia é a proteína Ki-67, um antígeno nuclear que é expresso em todas as fases do ciclo celular exceto em G0 (Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008).

O anticorpo Ki-67 reconhece uma proteína nuclear não histona, que se encontra associada à proliferação celular. A sua expressão ocorre durante todas as fases ativas, do ciclo celular, isto é, G1, S, G2 e M e declina rapidamente após a mitose, não tendo expressão na fase de repouso G0 (Scholzen e Gerdes., 2000). Devido a estas características é um excelente marcador da proliferação celular, sendo amplamente utilizado em colorações imunohistoquímicas de rotina (Scholzen e Gerdes., 2000).

Em medicina veterinária a expressão do marcador Ki-67 (clone MIB-1) foi identificada em diversas neoplasias inclusive no melanoma, tendo-lhe sido atribuído valor prognóstico (Peña *et al.*, 1998; Scase *et al.*, 2006). No que respeita às neoplasias orais apenas para o melanoma do cão foi encontrada correlação deste marcador com o prognóstico (Van Diest *et al.*, 1998; Millanta *et al.*, 2002). A grande expressão de Ki-67 também pode estar associada ao aumento da proteína p53. Num estudo, realizado por (Moretti *et al.*, 2001) demonstrou-se a correlação positiva entre a expressão de Ki-67, o potencial metastático, e a mortalidade somente em determinados melanomas de considerável tamanho, Frahm *et al.*, 2001 demonstraram uma correlação similar, porém, os resultados foram mais significativos, nos melanomas, de menor diâmetro.

Estudos têm demonstrado, aumento na taxa de recorrência e mortalidade, que diretamente podem estar relacionados com o aumento na positividade para Ki-67, enquanto outros estudos, analisaram que, essa correlação, não deve ser feita isoladamente, sem considerar os parâmetros histopatológicos que deverão incluir a espessura tumoral em milímetros (índice de Breslow) (Frahm *et al.*, 2001; Hazan *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004).

II. Proteína S100 β

Na proteína S100 β o termo "S100" está relacionado com uma característica específica, o facto de serem solúveis em solução saturada a 100%, de sulfato de amónia, e a denominação " β " está relacionada, com a presença de duas subunidades β (Brochez e Naeyaert 2000). Esta foi isolada pela primeira vez em meados dos anos sessenta, a partir do cérebro bovino e, nos últimos anos, tem sido, amplamente investigada, no âmbito da investigação oncológica (Vereecken *et al.*, 2012, Tendler, Mosch e Pietzsch, 2012).

As proteínas S100 β regulam a fosforilação de proteínas, a dinâmica dos componentes do citoesqueleto, a ativação de enzimas, e de fatores de transcrição. Influenciam o crescimento e a diferenciação celular, bem como processos inflamatórios, e a homeostasia do cálcio intracelular (Donato., 2007; Pietzsch., 2011; Tendler, Mosch e Pietzsch, 2012). São expressas, pelas células da glia e pelos melanócitos, e estão presentes nos tumores cerebrais e no melanoma (Tendler, Mosch e Pietzsch, 2012). A S100 β é um bom marcador em neoplasias agressivas, em estádios avançados e na doença metastática, quando comparamos com neoplasias não invasivas e não metastáticas. Deste modo, as proteínas S100 β estão a ser propostas, como biomarcadores promissores de prognóstico, em várias neoplasias, inclusive no caso específico do melanoma (Xie, *et al.*, 2009, Tendler, Mosch e Pietzsch 2012, Vereecken, *et al.*, 2012).

O nível sérico de S100 β , está relacionado com a carga tumoral, e reflete o estágio clínico e a progressão da doença. Há evidência crescente, de que, a avaliação de S100 β em amostras séricas seriadas, é útil para prevenção de doentes com melanoma e pode ser utilizada para a sua monitorização (Leclerc, Heizmann e Vetter., 2009; Vereecken *et al.*, 2012). Todavia, apesar da maior expressão de S100 β estar correlacionada com estádios mais avançados do melanoma, segundo Kruijff e colaboradores (2009), os níveis séricos de S100 β não são adequados para a deteção precoce do melanoma.

Presume-se que uma neoplasia em estágio inicial não produz quantidades suficientes de marcadores tumorais, de modo a elevar significativamente o seu nível sérico (Kruijff, *et al.*, 2009).

III. HMB-45

O anticorpo HMB-45, foi descrito pela primeira vez por Gown *et al.*, em 1986. É um anticorpo que reconhece a glicoproteína melanossomal gp100, e foi o primeiro marcador específico descrito, para o melanoma (Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008).

Este anticorpo é de grande importância na diferenciação entre melanomas e outras neoplasias não melanocíticas (Yu *et al.*, 2005).

Não é tão sensível como a proteína (S100), mas apresenta grande especificidade (Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008). O HMB-45 é expresso no citoplasma, com sensibilidade variando de 69% a 93%, sendo que a sua expressão é máxima nos melanomas primários (77-100%), principalmente com morfologia epitelióide. (Ohsie *et al.*, 2008)

Como a sensibilidade e a expressão é menor em melanomas metastáticos, cerca de 58-83%, é necessário o uso de outros marcadores como HMB-45. (Ohsie *et al.*, 2008).

IV. Melan-A

O Melan-A é um marcador de diferenciação melanocítica, produto do gene *MART-1*, identificado como uma proteína citoplasmática de diferenciação melanossomal, descoberto por Jungbluth *et al.*, em 1998 (Yu *et al.*, 2005; Ohsie *et al.*, 2008).

São conhecidos dois clones do anticorpo contra esta proteína: M2-7C10 e A103 (Carlson *et al.*, 2009). Apesar de existir uma correlação de quase 100% em relação aos clones com respeito à marcação do melanoma, o clone A103 também marca tumores adrenocorticais e gonodais, enquanto o clone M2-7C10 é negativo para esses tumores (Busam, 2004).

O Melan-A mostra uma sensibilidade, similar ao HMB-45, de 75% a 92% e especificidade de 95% a 100% para Melanoma (Dabbs, 2002). Apresenta sensibilidade maior que o HMB-45 e similar ao S100 em melanomas epitelióides primários, e na marcação de lesões melanocíticas benignas e malignas, porém é menos sensível em melanomas de células fusiformes e normalmente não é expresso na variante desmoplásica (Busam, 2004; Mckee *et al.*, 2005).

V. Tirosinase

A tirosinase é uma enzima chave, para a biossíntese do pigmento da melanina, promove a hidroxilação da tirosina como o primeiro passo na sua síntese. O anticorpo monoclonal T311 reconhece a proteína tirosinase. Em melanomas, a tirosinase pode ser vista como, uma

marcação citoplasmática finamente granular, forte e difusa. A sensibilidade da tirosinase para o melanoma, é de 84% a 94%, é mais eficaz, do que a do HMB-45.

A sensibilidade diminui com o desenvolvimento clínico da lesão e em lesões metastáticas (79% a 93%) (Mckee *et al.*, 2005). A especificidade da tirosinase para o melanoma é de 97% a 100%, e sua expressão é restrita aos melanócitos, assim como os anticorpos HMB-45 e Melan-A, a tirosinase tem maior expressão em tumores epitelioides. A maioria dos melanomas desmoplásicos são negativos para T311 (Prasad *et al.*, 2001).

VI. p53

A proteína p53 é codificada por um gene supressor tumoral que controla o ciclo celular nos estádios G1 e G2, onde o DNA danificado pode então ser reparado (Tanaka *et al.*, 2001; Ohsie *et al.*, 2008). Esta proteína induz a expressão de (p21), que ajuda a inibir a síntese de DNA (Tanaka *et al.*, 2001).

Usualmente a proteína p53 apresenta, uma semivida curta, não sendo normalmente identificada pela imunohistoquímica. A proteína p53 normalmente não é observada em lesões melanocíticas benignas, porém apresenta marcação positiva em 25% a 58% dos melanomas (Tanaka *et al.*, 2001; Ohsie *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 1997) não se observou relação direta entre, a marcação de p53 e uma maior probabilidade de metástase ou recorrência da doença. No entanto, Talve K. *et al.*, 1996) observou a relação direta entre o nível de marcação da proteína p53 com o prognóstico do melanoma, porém tal avaliação não deve ser feita de forma independente, sem correlação com o nível histológico de espessura do tumor, para avaliação do prognóstico.

VII. COX 1 e COX 2

A enzima cicloxigenase (COX) apresenta duas isoformas, a COX-1, que é expressada em variados tecidos e participa ativamente na regulação de funções fisiológicas normais, como a protecção da mucosa gástrica, controlo da agregação plaquetária, função reprodutora e renal .

Já a COX-2, ausente em células normais, pode ser induzida por fatores de crescimento, reações inflamatórias, promotores tumorais e oncogenes (Williams & DuBois, 1996).

No estudo realizado por Pires, Garcia, Prada, & Queiroga (2010), a expressão de ambas as COX-1 e COX-2 foi avaliada ao determinar a percentagem de células positivas, definição da sua intensidade e atribuindo uma pontuação de reatividade. No geral, a expressão de ambas foi positiva para os melanomas da pele, oral e ocular. A expressão de COX-1, como

seria de esperar, foi observada na grande maioria das amostras de tumores, assim como em amostras de tecido cutâneo e oral ausentes de neoplasia. Já a COX-2, não foi expressada em tecidos normais, ou nos melanomas benignos, mas sim numa grande porção dos melanomas malignos.

VIII. iNOS (Sintase do óxido nítrico induzível)

O NO é um mensageiro intracelular, que está relacionado com a resposta imunológica, além de estar envolvido em mecanismos de regulação neuronal e cardiovascular. Ele é produzido por um grupo de isoenzimas denominadas de óxido nítrico sintases, do inglês “nitric oxide synthase” (NOS) (Bredt *et al.*, 1990).

. A iNOS é expressa pelos macrófagos e pela grande maioria das células do sistema vascular, assim como células musculares lisas e cardiomiócitos, produz o NO responsável pela eliminação de agentes patogênicos. É considerado um biomarcador de fenótipos tumorais mais agressivos, nomeadamente, o melanoma oral com um importante auxílio no prognóstico. Pensa-se que a sua regulação poderá estar intimamente associada ao microambiente tumoral com destaque para as citocinas, hipóxia, privação de nutrientes e vários fatores metabólicos (Ezmeckcioglu.S *et al.*, 2006)

O seu contributo para o desenvolvimento e progressão tumoral tem sido reportado em vários tumores, entre eles, o carcinoma e o melanoma oral (Ezmeckcioglu.S *et al.*, 2006).

7.3. Imagiologia

Os exames complementares para diagnosticar as neoplasias orais devem incluir radiografias torácicas, para avaliar presença de metástases pulmonares, radiografias ou tomografias da cavidade oral para delimitar as lesões e avaliar a invasão dos tecidos subjacentes, nomeadamente o tecido ósseo, e para delimitar as lesões (Biller *et al.*, 2016; Liptak., Kemper *et al.*, 2012; Withrow, 2007).

Como se disse anteriormente, existe um número limitado de meios complementares de diagnóstico. Felizmente, a tomografia computadorizada juntamente com a ressonância magnética constituem atualmente, as técnicas mais específicas e sensíveis para a avaliação das lesões intraorais (Bagley, 2005; Kraft & Gavin, 1999; Jones, 2004; O'Brien & Axlund., 2005 e Pollard, Reilley, Uerling, Wood & Feldman., 2010).

As principais vantagens da tomografia computadorizada sobre a radiografia são, a capacidade de detetar alterações mais subtis da densidade dos tecidos, a eliminação de sobreposições de estruturas anatómicas, e a capacidade de ajustar a imagem de acordo com

as necessidades, no sentido de melhorar a visualização das diferentes estruturas (Jones, 2004), sem ser um método invasivo (LeCouteur, Fike, Cann & Pedroia., 1981).

Com o auxílio destas tecnologias permite avaliar a extensão tumoral e a sua localização neuroanatômica, muitas vezes necessária para uma biopsia, cirurgia ou radioterapia (March, 2000).

8. Estadiamento tumoral

O processo de estadiamento, implica a determinação da extensão de uma neoplasia a nível local e à distância, isto é, a presença ou ausência de metástases nos linfonodos regionais ou em órgãos distantes (Morris & Dobson, 2001; Biller *et al.*, 2016; Munday *et al.*, 2016). O estágio tumoral é importante para a determinação do prognóstico e instituição de uma terapêutica adequada dado que um tratamento bem-sucedido passa pela erradicação de todas as células tumorais, a qual apenas pode ser alcançada quando se conhece a completa extensão do tumor (Biller *et al.*, 2016).

Atualmente encontra-se estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um sistema anatómico com critérios de estadiamento, designado de TNM (*Tumor, node, metastasis*), adaptado por Owen em 1980, em que T, de tumor, designa a dimensão, o grau de invasão, e ulceração da massa, o N de linfonodo regional, inclui a invasão, o número e tamanho dos linfonodos envolvidos, e o M, ausência ou presença de metástases, ver quadro 4 (Morris & Dobson., 2001; Bergman., 2007). (Ver figura 5, anexo).

Quadro 4 - Estadiamento clínico para neoplasia oral em cães e gatos segundo sistema TNM da Organização Mundial de Saúde (OWEN 1980).

T: Tumor primário
T ₁ : Tumor < = 20mm de diâmetro, volume < 8 cm
T ₂ : Tumor 20-40mm de diâmetro, volume 8-64 cm
T ₃ : Tumor > 40mm de diâmetro, volume > 64cm
a: sem evidência de invasão no tecido ósseo; b: com evidência de invasão no tecido ósseo
N: Linfonodos Regionais
N ₀ : Não evidência de envolvimento nos linfonodos regionais
N _{1b} : Evidência histológica/citológica de envolvimento em um dos linfonodos regionais
N _{2b} : Evidência histológica/citológica de envolvimento de mais do que um linfonodo regional
N ₃ : Linfonodos fixos
a: sem evidência de metástase; b: com evidência de metástase
M ₀ : Sem evidências de metástases à distância
M ₁ : Presença de metástases à distância
Estadio I: T ₁ , N ₀ , N _{1a} , N _{2a} , M ₀
Estadio II: T ₂ , N ₀ , N _{1a} , N _{2a} , M ₀
Estadio III: T ₃ , N ₀ , N _{1a} , N _{2a} , M ₀
Estadio IV: Qualquer T; N _{1b} , M ₀ ; N _{2b} , N ₃ , M ₀ ; qualquer N e M ₁

Quadro 5 - Estadiamento clínico para melanoma oral em cães. Adaptado de (Bergman *et al.*, 2003).

T: Tumor primário
T1a melanomas não ulcerados com espessura < 0,8 mm.
T1b (duas possibilidades): melanomas com espessura entre; 0,8 e 1,0 mm, independente de ulceração; < 0,8 mm, com ulceração
T2a >1,0-2,0 mm Sem ulceração
T2b >1,0-2,0 mm Com ulceração; > 2,0-4,0 mm desconhecido ou não especificado
T3a >2,0-4,0 mm Sem ulceração
T3b >2,0-4,0 mm Com ulceração ; >4,0 mm desconhecido ou não especificado
T4a >4,0 mm Sem ulceração
T4b >4,0 mm Com ulceração

L: Linfonodos regionais

N₀: Não evidência de envolvimento nos linfonodos regionais

N₁: Evidência citológica/histológica de envolvimento nos linfonodos regionais

N₂: Linfonodos fixos

M: Metástases à distância

M₀: Sem evidências de metástases à distância

M₁: Presença de metástases à distância

I: T₁ N₀ M₀

II: T₂ N₀ M₀

III: T₂ N₁ M₀ ou T₃ N₀ M₀

IV: Qualquer T; Qualquer N e M₁

9. Tratamento

O objetivo de qualquer tratamento é sempre a cura, ou seja, a erradicação de todas as células estaminais tumorais. No entanto, esta nem sempre é alcançável mesmo com os métodos terapêuticos avançados que estão atualmente disponíveis. A decisão de tratar um animal oncológico deve ser tomada, em simultâneo, pelo médico veterinário e pelo seu tutor que deve ser informado da natureza da doença, do prognóstico e das possíveis opções de tratamento (Morris & Dobson, 2001; Biller *et al.*, 2016).

No simpósio da VSSO (*Veterinary Society of Surgical Oncology*) realizado em 2016, o MMO foi discutido por diversos médicos veterinários com interesse em cirurgia oncológica. Desta discussão foram obtidas diretrizes clínicas, nomeadamente em relação ao tratamento a aplicar nesta neoplasia. A terapêutica recomendada para o MMO inclui a nível local a exérese cirúrgica com intenção curativa ou radioterapia (ou ambas), e ainda terapia adjuvante a nível sistémico. (London *et al.*, 2012; Tuohy, Selmic, Worley, Ehrhart & Withrow., 2014; Biller *et al.*, 2016).

O tipo de cirurgia dependerá da localização do tumor; a mandibulectomia ou a maxilectomia (total ou parcial), procedimentos indicados para a maioria dos tumores orais com extensa invasão óssea, são geralmente bem tolerados pelos cães. Aconselha-se a que, durante a ressecção cirúrgica, se realizem margens de segurança, com pelo menos 2 centímetros, e quando há algum tecido ósseo envolvido a ressecção cirúrgica deve incluir as margens ósseas para aumentar a taxa de remoção total do tumor. (Liptak; Withrow., 2007).

A alimentação entérica, através de sonda nasogástrica não é normalmente necessária após a cirurgia oral em cães. É fundamental consciencializar o proprietário sobre os possíveis efeitos colaterais no pós-cirúrgico. As complicações pós-operatórias podem incluir, a epistáxis, sialorreia, nariz pendente, desvio/ptose de língua, fístula oronasal, ptialismo, desvio mandibular, má oclusão, dificuldade em prender os alimentos e deiscência das suturas, dependendo do procedimento cirúrgico realizado (Liptak; Withrow., 2007; Fonseca *et al.*, 2014). Apesar da ausência de resposta satisfatória na utilização de tratamentos que não contemplam a cirurgia, vários estudos têm sido realizados para se achar alternativas eficientes no tratamento dos melanomas orais, em cães.

A **criocirurgia**, muitas vezes referida como crioterapia ou crioblacção, é uma técnica cirúrgica, que emprega o frio em temperaturas criogênicas, para destruir tecidos ou células indesejáveis. Uma das suas vantagens é a destruição celular localizada, minimizando os danos ao tecido saudável adjacente, no local congelado.

Contudo, a natureza minimamente invasiva da criocirurgia ocasiona algumas dificuldades no controle do procedimento. À medida que o frio se propaga pela sonda, a extensão do tecido afetado pelo congelamento não pode ser determinada exatamente pelo cirurgião, e muitas vezes resulta, na perda da precisão e de controlo (Chua KJ, Chou SK; Ho JC *et al.*, 2007).

Alguns criogénicos, já foram utilizados na criocirurgia, tais como: dióxido de carbono, enxofre, acetona, óxido nitroso, “freons”, mas foram retirados, devido às suas desvantagens (temperatura atingida insatisfatória, uso restrito, área de destruição tecidual pequena) (Ameerally PJ; Colverg GB., 2007).

Os criogénicos mais utilizados são o nitrogénio líquido e o gás argónio, sendo que o primeiro atinge seu ponto de ebulição de -195,8°C, sendo um gás incolor, inodoro, não inflamável, atóxico e inerte, de baixo custo e cujo acondicionamento deve ser feito em recipientes apropriados com capacidades de armazenamento de 10 a 50 L (Eurides, D. *et al.*, 2010).

Muitas teorias têm sido propostas para explicar a morte tecidual pela crioterapia. A mais estudada é a lesão celular direta, causada por temperaturas extremas, originando, lesões nos organelos celulares, tais como mitocôndrias e retículo endoplasmático, e causando a subsequente morte celular. Outro mecanismo citado, envolve alterações vasculares do tecido congelado, gerando necrose isquémica, por formação de trombos, e ainda uma provável estimulação imunológica propiciada pela lesão celular, que expõe, o organismo a antígenos-alvo intracelulares em grandes quantidades (Hoffmann; Bischof, 2002).

Durante o congelamento formam-se cristais intracelulares e extracelulares. Os cristais extracelulares alteram o gradiente osmótico entre o meio intracelular e o extracelular, o que

provoca a saída de água do interior da célula para o exterior. Desta forma, no interior da célula fica uma quantidade tóxica de eletrólitos que alteram o pH das macromoléculas e da membrana celular, provocando uma lesão irreversível na célula (Queiroz & Matera, 2004). De forma indireta, a lesão criogénica provoca estase vascular e anoxia tecidual, resultando em necrose e isquemia. Duas horas após o congelamento pode-se observar edema, danos focais nos capilares, hemorragia e formação de microtrombos. Oito horas depois verifica-se necrose focal ou segmentar dos vasos (Queiroz & Matera, 2003). Os queratinócitos apresentam resistência considerável à congelação e esta ocorre apenas a temperaturas que rondam os -20°C e os -30°C.

De entre as complicações mais comuns da criocirurgia, destacam-se as hemorragias, os edemas e a dor, durante ou após o tratamento. Também se pode verificar retração tecidual, alopecia e hipopigmentação. As lesões pós-cirúrgicas cicatrizam por segunda intenção (de 4 a 14 semanas), o que leva à formação de tecido de granulação e de crosta. (Queiroz & Matera, 2003). As vantagens desta técnica são: a celeridade, facilidade de aplicação, baixo custo e segurança, a criocirurgia reduz o tempo necessário da anestesia geral, podendo mesmo ser efetuada sem recurso à mesma. (Queiroz & Matera, 2003).

Existem ainda, relatos (sem definição do mecanismo causador) na diminuição, da formação de metástases à distância, em processos neoplásicos tratados com criocirurgia, além de outro mecanismo recentemente citado, da indução (resultante da hipotermia) de apoptose nas células periféricas das lesões criotratadas (Eurides D., *et al.*, 2010).

A **radioterapia** também pode ser utilizada como tratamento primário ou complementar no caso de tumores incompletamente removidos (Liptak; Withrow, 2007). Esta permite obter um controlo local da doença, neste caso, nos melanomas orais, sendo utilizada para tratar volumes tumorais de dimensões microscópicas resultantes de uma incompleta exérese cirúrgica, por exemplo (Blackwood & Dobson, 1996; Freeman *et al.*, 2003; Bergman *et al.*, 2013; Biller *et al.*, 2016). Este procedimento pode ter como objetivo a cura, ou seja, a erradicação de todas as células tumorais viáveis existentes ou ser apenas paliativa, no sentido de melhorar a qualidade de vida e minimizar o desconforto do animal (Bergman *et al.*, 2013).

Segundo Cunha *et al.*, (2013), a radioterapia pode ser um tratamento paliativo eficaz em cães com melanoma, no entanto, a sobrevida dos animais após o tratamento é curta devido às metástases ou recidivas locais, e como efeitos colaterais, a mucosa oral pode desenvolver reações agudas como estomatites e glossites.

Na **quimioterapia**, de acordo com a literatura veterinária, a quimioterapia sistémica para o tratamento do MMO não tem tido resultados promissores (Brockley, Cooper & Bennett, 2013; Boston *et al.*, 2014; Tuohy *et al.*, 2014), contudo, o fármaco carboplatina, é o quimio-

rápico sistêmico de eleição nos melanomas caninos, sem, todavia, fornecer um controle satisfatório quer local, quer a nível da prevenção, na instalação de metástases (Proulx *et al.*, 2003). Outros agentes quimioterápicos foram testados, como dacarbazina, a doxorubicina e a cisplatina, no entanto os resultados apresentados por estes fármacos também não se mostraram abonatórios (Alexander *et al.*, 2006).

Na **terapia adjuvante**, os avanços na tecnologia de vacinas de DNA, permitiram o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, para o tratamento de certos tipos de neoplasias, como o melanoma canino.

A vacina terapêutica (ONCEPT®, Merial Saúde Animal) foi aprovada pelo USDA, (United States Department of Agriculture) para o tratamento do melanoma oral. Esta vacina é produzida com o gene da tirosinase de seres humanos inserido no material genético de uma bactéria (plasmídeo). Essa tecnologia é conhecida como tecnologia do DNA xenogénico. (Bergman & Wolchok., 2008; Bergman *et al.*, 2013; Treggiari, Grant & North., 2016).

A tirosinase é uma enzima envolvida na síntese da melanina, sendo expressa tanto pelos melanócitos normais, quanto pelos neoplásicos (melanoma). Após a injeção intramuscular da vacina, o antígeno da tirosinase é produzido e expresso pelos miócitos do animal, sensibilizando, o seu sistema imune. Como a tirosinase está presente em grandes quantidades nos melanócitos, e praticamente ausente em outras células, é um excelente antígeno-chave para a imunoterapia contra o melanoma. Quando combinada com tratamentos convencionais contra o melanoma oral canino, a vacina, xenogénica, é considerada uma imunoterapia eficaz, capaz de prolongar o tempo, de sobrevivência dos animais. (Bergman *et al.*, 2003; Bergman *et al.*, 2013, Treggiari *et al.*, 2016).

Anti-inflamatórios, A cicloxigenase (COX) tem duas isoenzimas, a Cox-1 e a Cox-2, que catalisam a etapa inicial da síntese de prostaglandinas, a partir do ácido araquidónico. A Cox-1 -1 é expressa constitutivamente no organismo e está envolvida na homeostase, enquanto a Cox-2 é uma isoforma induzida que se encontra primariamente em locais de inflamação, sendo a sua principal função, a de produção de prostaglandina E2 (PGE2).

Desde o início da década de 90, que as duas isoformas da Cox, Cox-1 e Cox-2, são reconhecidas como parte interveniente na produção da prostaglandina H2 (PGH2) (o primeiro passo na síntese dos prostanoides) (Warner & Mitchell, 2004). Contudo, surgiram já novas isoformas destas enzimas, como a Cox-3, presente no córtex cerebral humano e canino, e a PCox (Cox parcial), ambas consideradas formas variantes da Cox-1 (Simmons, 2003).

A **Cox-1** foi purificada pela primeira vez em 1976 e expressa-se, em diversos tecidos, como os rins, pulmões, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon e cego de macacos, cães, ratos e humanos (Williams *et al.*, 1999). Esta enzima apresenta várias funções fisiológicas

que mantêm a homeostasia e tem uma relevância na proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, controlo do fluxo sanguíneo renal e equilíbrio vascular (Lee *et al.*, 2003).

A **Cox-2**, por sua vez, só se expressa constitutivamente na placenta, mácula densa do rim e cérebro (Williams *et al.*, 1999). Encontra-se em quantidades residuais nas células e tecidos normais, exceto quando a sua expressão é induzida em resposta a um ou vários tipos de estímulos (Chandrasekharan & Simmons, 2004).

Após o estímulo, a sua expressão aumenta rapidamente, nomeadamente nas células envolvidas na inflamação, como fibroblastos, monócitos e endotélio vascular (Parente & Perretti, 2003).

As ciclooxigenases 1 e 2 são os principais alvos terapêuticos dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Está provado que os AINEs afetam diretamente a ação das ciclooxigenases, seja por modificarem as ligações covalentes da enzima, seja por competirem com o substrato pelo seu sítio ativo (Williams *et al.*, 1999). A inibição, da atividade das ciclooxigenases é o mecanismo pelo qual os AINEs exercem as suas funções analgésicas, antipiréticas, antiinflamatórias e antitrombóticas (Lee *et al.*, 2003). Contudo, até alguns anos atrás, a ação inibitória destes fármacos estava direcionada, para ambas as enzimas, principalmente para a Cox-1, o que se traduzia numa toxicidade gastrointestinal, diretamente proporcional ao poder seletivo dos AINEs, para a Cox-1 (Warner & Mitchell, 2004). Este tipo de AINEs apresentam efeitos secundários graves para o animal, ao inibirem a função protetora, da Cox-1, e que incluem ulceração, hemorragia e perfuração gastrointestinal (Williams *et al.*, 1999).

Nos canídeos, a expressão da Cox-2 foi investigada em tumores como: linfoma, carcinoma prostático, osteossarcoma, fibrossarcoma e melanoma oral (Mohammed *et al.*, 2004).

Assim, atualmente, os inibidores selectivos da Cox-2 têm sido alvo de especial interesse. Estes fármacos aparentam atuar, diminuindo a síntese de prostaglandinas através da inibição da Cox-2 (comummente sobre expressa em tumores) e, conseqüentemente, suprimindo a proliferação celular, possivelmente pelo meio da indução da apoptose (Arenas *et al.*, 2016).

10. Prognóstico

O prognóstico dos tumores malignos é reservado (Vail; Withrow., 2007). Em casos de recorrência, o tratamento torna-se mais complicado, com o agravamento efetivo do prognóstico (Fonseca *et al.*, 2014). Em relação à histopatologia, o índice mitótico, a atipia nuclear, o grau de pleomorfismo celular e nuclear, o nível de inflamação linfocítica profunda e de necrose intralesional, a reação do estroma, o grau de invasão, entre outros, fornecem informação adicional ao prognóstico, existindo uma relação entre uma maior diferenciação e um melhor prognóstico (Spangler & Kass., 2006; Esplin., 2008; Tuohy *et al.*, 2014).

O estadio é um fator prognóstico, como referido anteriormente, dado que quanto mais avançado for, maior é a probabilidade de existirem metástases disseminadas e, como tal, está associado a um menor tempo de sobrevida livre de doença e tempo de sobrevida global (Liptak & Withrow., 2013; Tuohy *et al.*, 2014).

A localização da lesão e as margens cirúrgicas são fatores com valor prognóstico que se relacionam entre si pois os casos mais acessíveis cirurgicamente, como os que se localizam na mandíbula rostral ou na maxila caudal, permitem margens mais amplas e, como tal, estão associados a um maior tempo de sobrevivência e a um melhor prognóstico (Hahn *et al.*, 1994; Bergman *et al.*, 2013). O facto de os tumores localizados rostralmente estarem associados a um prognóstico mais favorável pode também ser devido ao facto de estas lesões estarem mais visíveis, permitindo uma deteção mais precoce pelos tutores e médicos veterinários. Para além disso, as porções caudais da maxila e da mandíbula têm uma rede vascular mais extensa e desenvolvida do que as porções rostrais, o que significa que os MMO localizados mais caudalmente têm, de um modo geral, uma maior capacidade de invasão dos tecidos da sua periferia e uma maior probabilidade de metastização (Wallace *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2002; Proulx *et al.*, 2003; Bergman., 2007; Tuohy *et al.*, 2014).

No entanto, de acordo com os resultados de Tuohy *et al.*, 2014, não há relação entre a localização e o comportamento biológico do MMO e desde que se consiga obter margens amplas quando se realiza exérese cirúrgica das lesões localizadas caudalmente, ou das que se encontram aderentes à maxila ou mandíbula o prognóstico não difere do das lesões mais rostrais ou localizadas apenas nos tecidos moles (sem invasão óssea).

Os casos que sejam consequência de uma recidiva após tratamento cirúrgico ou radioterapia estão também associados a um pior prognóstico (Liptak & Withrow., 2013).

11. Objetivos do trabalho

Os objetivos específicos deste estudo incluíram:

- Revisão bibliográfica acerca do Melanoma oral canino;
- Estudo da expressão imunohistoquímica da iNOS nestes tumores;
- Relação desta com as variáveis clínicas e histopatológicas do tumor;
- Contribuição para o conhecimento de fatores de prognóstico do melanoma oral canino;

12. Material e métodos

I. Material

Na elaboração deste trabalho, foram analisados, quinze tumores melanocíticos caninos orais, cedidos, pelo Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de São Paulo-Brasil.

Todas as amostras foram obtidas por biopsia ou exérese cirúrgica e recebidas fixadas em formol a 10% tamponado.

II. Métodos

12.1 Avaliação clínica

Em todos os casos possíveis, foram recolhidas informações referentes à identificação do animal (idade, género, raça), tamanho, localização da lesão e existência de metástases na altura do diagnóstico.

12.2. Estudo histopatológico

As amostras de biopsia foram colhidas, e fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina sintética Histoplast®- Shandon®, seguindo a metodologia habitual. Após inclusão, foram realizados cortes de cada um dos tumores com 3 µm de espessura num micrótomo automático Leica® RM 2255. Em seguida, os cortes foram dispostos em lâminas e levados à estufa a 37°C para secarem. Após este passo, foram desparafinados em xilol, hidratados numa série de álcoois com concentrações decrescentes, (100%,90%,80%,70%), procedendo-se à coloração convencional com hematoxilina-eosina (HE) para posterior diagnóstico histopatológico.

- Branqueamento da melanina.

A presença de melanina nas lesões melanocíticas caninas dificulta o seu diagnóstico histológico, já que dificulta a observação das características citoplasmáticas e nucleares das células tumorais. Assim, para uma correta observação e classificação das lesões, foi efetuado o branqueamento das amostras.

Este método consistiu na desparafinação da amostra, na sua hidratação, colocação em permanganato de potássio (KMnO₄) a 0,1% durante a noite, passagem por água, colocação em ácido oxálico (H₂C₂O₄) a 1% durante 10 min, lavagem e posterior coloração com HE.

Todos os casos foram observados com a coloração de HE com e sem branqueamento. O diagnóstico histopatológico foi realizado em conformidade com os critérios da OMS (Goldschmidt *et al.*, 1998), por dois observadores independentes e segundo os mesmos critérios, num microscópio Olympus® BH-2.

Os critérios histológicos avaliados:

- **Atividade juncional:** presente (P) ou ausente (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- **Grau de atipia nuclear:** escasso (1), moderado (2), acentuado (3), segundo Millanta *et al.*, (2002);
- **Tipo celular:** fusiformes, epitelioides (redondas) e mistas, de acordo com as células predominantes no tumor, segundo Smith *et al.*, (2002);
- **Infiltração linfoplasmocitária:** presente (P) ou ausente (A).
- **Necrose intratumoral:** presente (P) ou ausente (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- **Células gigantes:** presentes (P), ou ausentes (A), segundo Spangler & Kass (2006);
- **Ulceração:** presente (P) ou ausente (A); Spangler & Kass (2006);
- **Grau de pigmentação celular:** ausente ou escasso (1), moderado (2), acentuado (3); segundo Spangler & Kass., (2006);
- **Células tumorais intravasculares (CTI):** presentes (P) ou ausentes (A), segundo Ramos-Vara *et al.*, (2000);
- **Quantidade de estroma:** escassa (1), moderada (2), acentuada (3), segundo Ramos-Vara *et al.*, (2000);
- **Índice mitótico:** A contagem de mitoses foi efetuada na coloração de HE com branqueamento. O índice mitótico foi expresso pelo número de mitoses por campo com a (objetiva 40x). Em média foram contados 10 campos, nas diferentes regiões do tumor. Foram,

em seguida categorizadas em 2 classes: 1- <3 mitoses; 2- ≥3 mitoses por campo, segundo Ramos-Vara *et al.*, (2000);

13. Estudo imunohistoquímico

Para a análise imunohistoquímica, foram efetuados cortes seriados de cada um dos tumores com 3 µm de espessura, sendo posteriormente colados em lâminas revestidas com solução de Silane (3-Aminopropyltriethoxysilane, Sigma ®), de acordo com a metodologia convencional.

A expressão da iNOS foi obtida pelo método da streptavidina biotina ligada à peroxidase, utilizando o sistema de deteção Ultravision, da Labvision ®. Em cada procedimento foram utilizados dois controlos: um positivo e um negativo.

Um linfonodo reativo de cão foi utilizado para servir como controlo positivo. No corte usado como controlo negativo, o anticorpo primário, foi substituído por tampão fosfato salino (PBS, com pH=7,4).

Adicionalmente, sempre que existiam macrófagos no tumor, estes constituíam um controlo positivo interno.

Numa primeira fase, foram testadas várias técnicas, com diferentes métodos de recuperação antigénica, com diferentes diluições e diferentes tempos de incubação. A técnica que conduziu à obtenção de preparações histológicas com uma melhor relação sinal/ruído foi escolhida e aplicada à totalidade da amostra.

Os cortes foram desparafinados em xilol durante 15 minutos, e hidratados com álcoois de concentração decrescente (100%, 90%, 80% e 70%).

Todos os cortes foram submetidos a um pré-tratamento térmico em micro-ondas (lâminas imersas em solução de tampão citrato com pH=6,2) durante 3 ciclos de 5 minutos a 750 W, para recuperação antigénica.

Após tratamento térmico, foram deixados a arrefecer à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida procedeu-se ao branqueamento dos cortes numa solução de permanganato de potássio (KMnO₄), a 0,1%, durante 30-40 minutos, seguida de imersão numa solução de ácido oxálico (H₂C₂O₄), a 0,1% durante 10 minutos.

A inibição das peroxidases endógenas foi conseguida com peróxido de hidrogénio a 3%, durante 30 minutos, sendo o seu excesso removido com PBS, em duas lavagens sucessivas. Os cortes foram incubados à temperatura ambiente, durante 5 minutos, com Bloqueador Ultra V. Em seguida, procedeu-se à incubação com o anticorpo policlonal anti- iNOS (Labvision®), na diluição de 1:100 em PBS com pH=7,4 por um período de 18 horas, a 4°C. Todas as incubações foram feitas em câmara húmida horizontal, BioOptica®.

Após o referido período de incubação, o anticorpo primário foi removido com três lavagens com tampão PBS e os cortes foram incubados 10 minutos com soro AntiPolivalente de Cabra Biotinilado (anticorpo secundário) à temperatura ambiente. Efetuaram-se três novas lavagens com PBS e nova incubação de 10 minutos com soro streptavidina à temperatura ambiente, à qual se seguiu uma lavagem.

A revelação das lâminas foi efetuada com uma incubação de 10 minutos em solução aquosa de tetra-hidrocloro de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) Novo Castra®, à qual se adicionou 2 µl de H₂O₂ (a 30%) por cada mililitro (ml) de solução.

Posteriormente, para a realização do contraste nuclear ou contra coloração, as lâminas foram imersas numa solução de Hematoxilina de Gill, durante 1 minuto, seguindo-se uma lavagem em água corrente morna até as lâminas contrastarem de azul (aproximadamente 10 minutos). Finalmente, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas, utilizando o Entellan (Merck®), que é um meio de montagem não aquoso.

13.1. Quantificação da imunorreatividade

A imunorreatividade foi avaliada por dois observadores de forma independente.

Foi considerada positividade, sempre que existia distinta marcação castanha no citoplasma das células tumorais e avaliada de forma comparativa com o controlo. Foram considerados a percentagem de células positivas (avaliação semiquantitativa) e a intensidade de marcação predominante (avaliação subjetiva), adaptado de Greene *et al.*, 2013.

Assim, a percentagem de células positivas foi categorizada em negativa, focal (1-25%); multifocal (26-75%) e difusa (76-100%). A intensidade de marcação foi classificada em negativo (0), fraca (1), moderada (2) e forte (3).

De forma a facilitar a análise estatística, os tumores foram categorizados em 2 grupos: 0 – negativos (onde se incluíram os tumores negativos ou com grau 1 de extensão) e 1-positivos (onde se incluíram os graus 2 e 3, independentemente da intensidade de marcação).

14. Análise estatística

Para a apresentação dos dados recorreu-se ao uso de tabelas e gráficos, com os respetivos dados estatísticos antecedidos de análise.

A análise dos dados foi realizada através de estatística descritiva e inferencial, utilizando-se o *software* SPSS-24.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Tendo em consideração o cumprimento dos critérios necessários para a realização de testes de hipóteses paramétricos, conclui-se que a amostra não segue uma distribuição normal na idade e no Índice Mitótico em função da iNOS, pelo que foi aplicado o teste de Mann-Whitney, teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável pelo menos ordinal medida em duas amostras independentes (Maroco, 2014).

Para associação das variáveis qualitativas foi aplicado o teste do Qui-Quadrado (χ^2) que serve para testar se duas ou mais populações (ou grupos) independentes diferem relativamente a uma determinada característica, isto é, se a frequência com que os elementos da amostra se repartem pelas classes de uma variável qualitativa é ou não aleatória. Foi também utilizado o teste de Fisher, usado como teste de significância estatística nas tabelas de contingência, aplicado em resultados estatísticos de amostras pequenas (Maroco, 2014).

15. Resultados

15.1. Avaliação clínica

Neste estudo foram avaliados quinze melanomas provenientes do Laboratório de Anatomia Patológica da Universidade de São Paulo onde a autora desenvolveu o seu estágio e o trabalho de investigação agora apresentado.

15.2. Localização, Raça, e Género

No que diz respeito à localização dos tumores, pode observar-se no quadro 6 que os quinze casos tinham localização oral, sendo que desses, um se apresentava com localização tonsilar, outro no lábio superior (maxila), quatro desses casos na maxila e nove na mandíbula.

Quadro 6- Localização

Localização	n	%
Mandíbula	9	60,0
Maxila	5	33,3
Tonsila	1	6,7

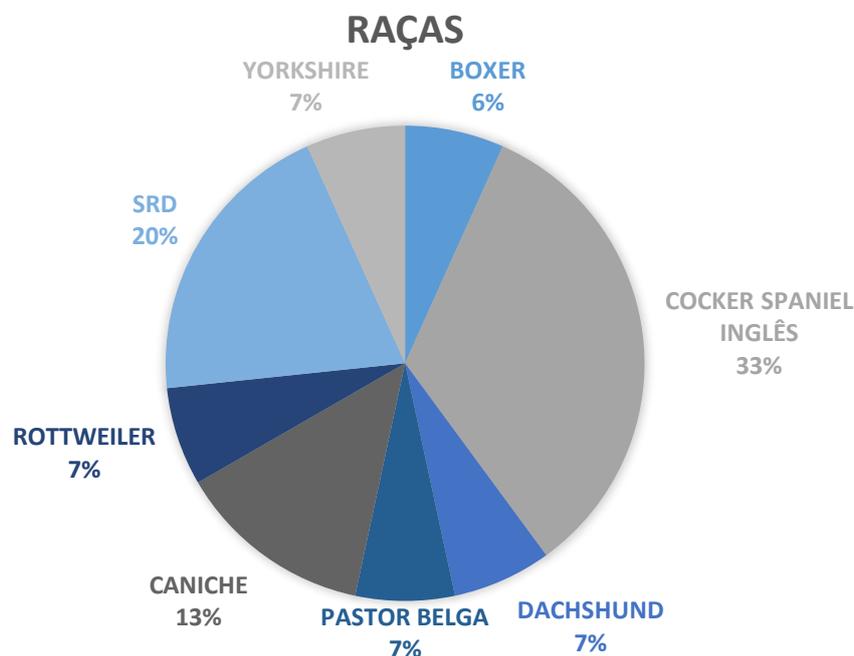
Relativamente à distribuição da raça dos cães em estudo (cf. quadro 7) estes eram na sua maioria de raça Cocker Spaniel Inglês (33,3%); SRD (20,0%) e Caniche (13,3%).

Quadro 7 - Distribuição de raças

Raça	n	%
Cocker Spaniel inglês	5	33,3
SRD	3	20,0
Caniche	2	13,3
Dachshund	1	6,7
Pastor Belga	1	6,7
Rottweiler	1	6,7
Yorkshire	1	6,7
Boxer	1	6,7

Dentro das raças com maior representatividade, como se pode observar no quadro 7 destaca-se a raça Cocker Spaniel Inglês (n=5) e SDR (n=3), no quadro 6, com uma localização predominante na mandíbula seguida de Caniche (n=2), com incidência na mandíbula e maxila, Dachshund (n=1), Pastor Belga (n=1), Rottweiler (n=1), com localização na mandíbula e Boxer e Yorkshire (n=1) na maxila.(cf. Gráfico 1)

Gráfico 1 - Distribuição da raça

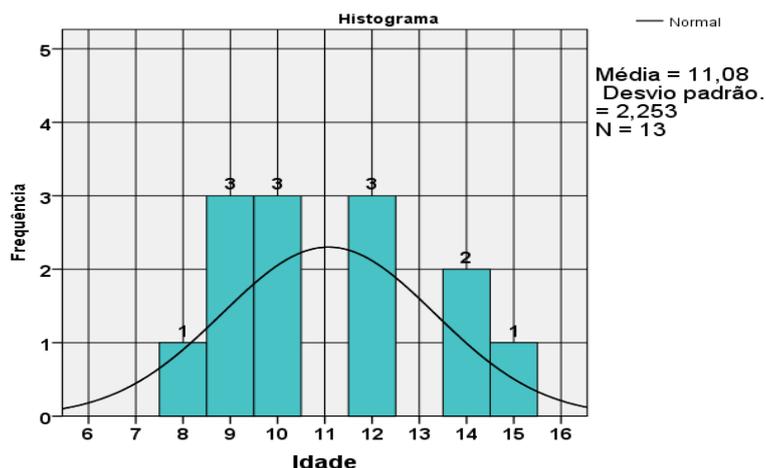


Em relação ao género 70% dos casos de melanoma oral estavam presentes em machos e 30% em fêmeas.

15.3. Idade

No que se refere à idade dos cães (cf. Gráfico 2) estes tinham uma idade mínima de 8 anos e máxima de 15 anos, com uma média de 11 anos, e um desvio-padrão de 2,253.

Gráfico 2 - Histograma da idade

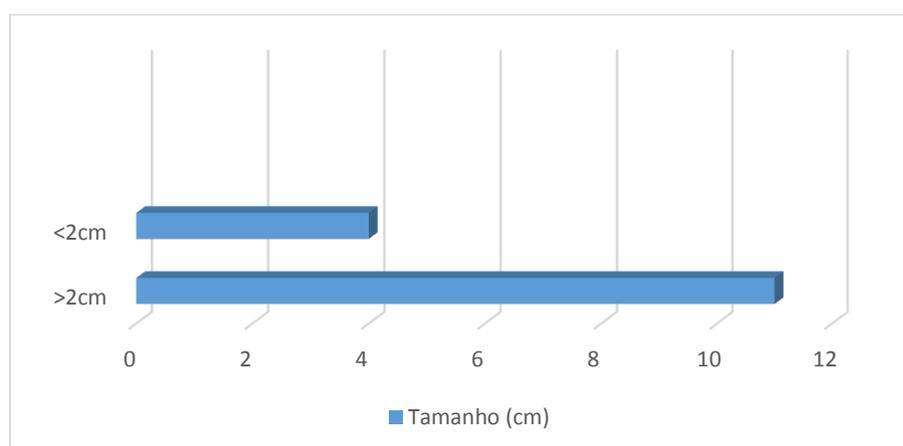


15.4. Tamanho

Relativamente à dimensão dos tumores, foram obtidos dados relativamente ao tamanho das 15 amostras.

No gráfico 3, podemos observar que a maior percentagem de tumores apresenta dimensões iguais ou superiores a 2 centímetros e apenas quatro apresentaram um tamanho inferior a 2 centímetros.

Gráfico 3 - Distribuição dos melanomas caninos por tamanho da lesão



1.5.5- Metástases

A avaliação da presença ou ausência das metástases, foram recolhidas na avaliação do animal. A presença de metástases esteve ausente em 80% dos animais em estudo e nos restantes 20% registou-se a presença das mesmas.

15.6. Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica dos quinze tumores melanocíticos caninos em estudo permitiu-nos verificar que nos melanomas orais a atividade juncional (figura 6), esteve presente em 100% dos casos.

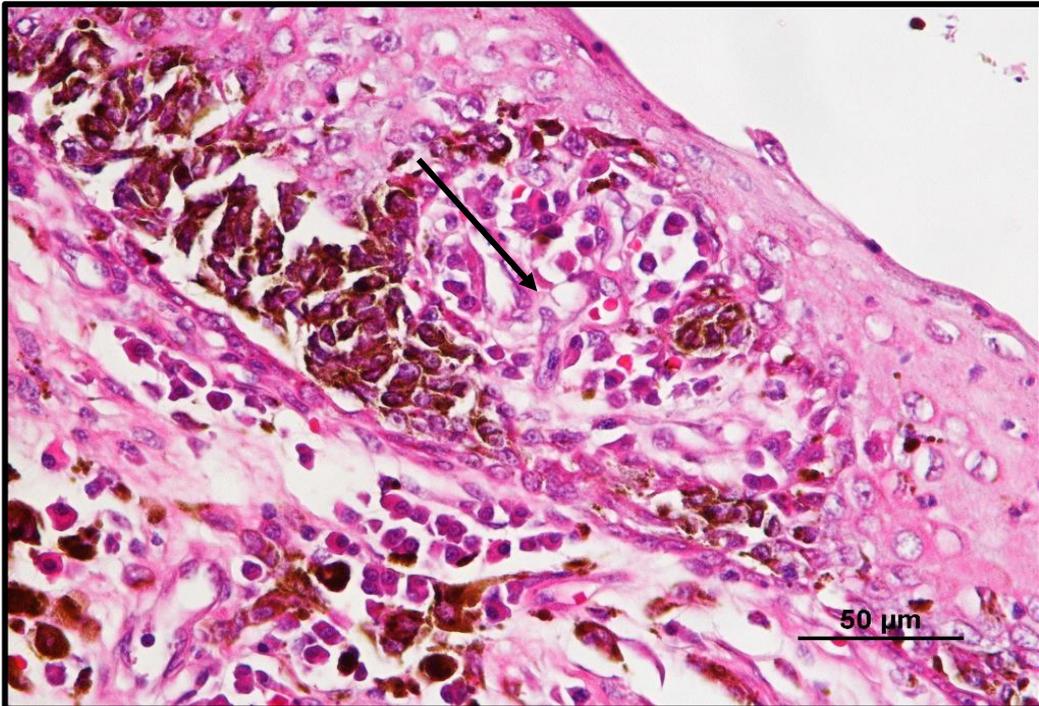


Figura 6 - Melanoma oral com atividade juncional e proliferação intraepitelial, (H&E).

Quanto à atipia nuclear (Fig.7), três cães apresentaram grau 2, moderado e doze apresentaram grau 3, acentuado. (Fig.8).

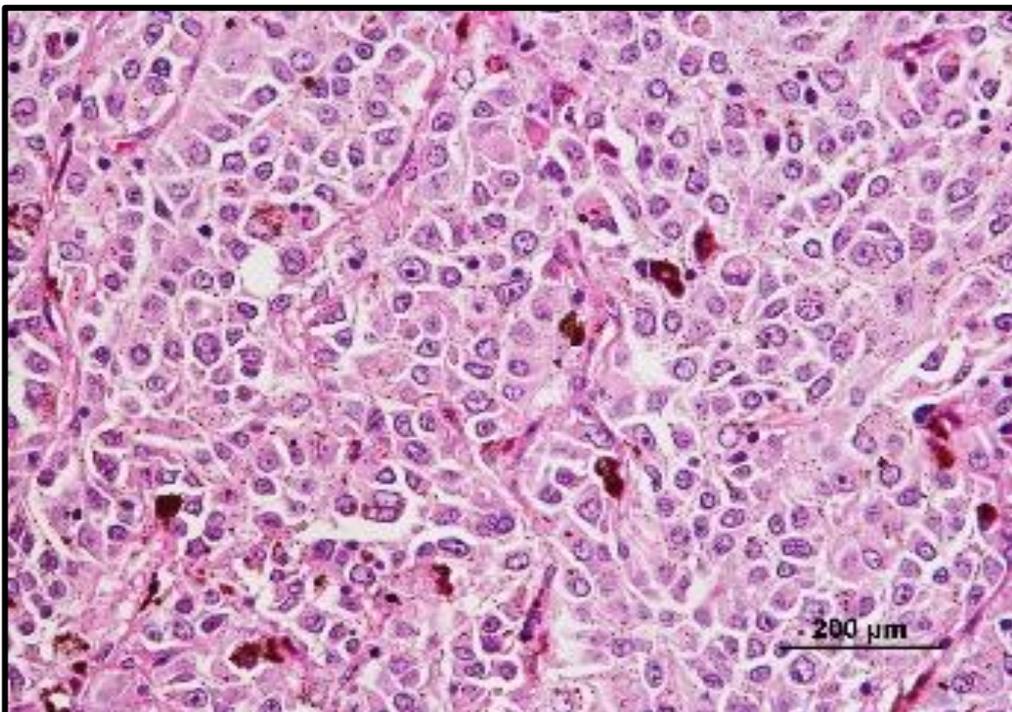


Figura 7 - Melanoma oral com moderada atipia nuclear (grau 2), (H&E).

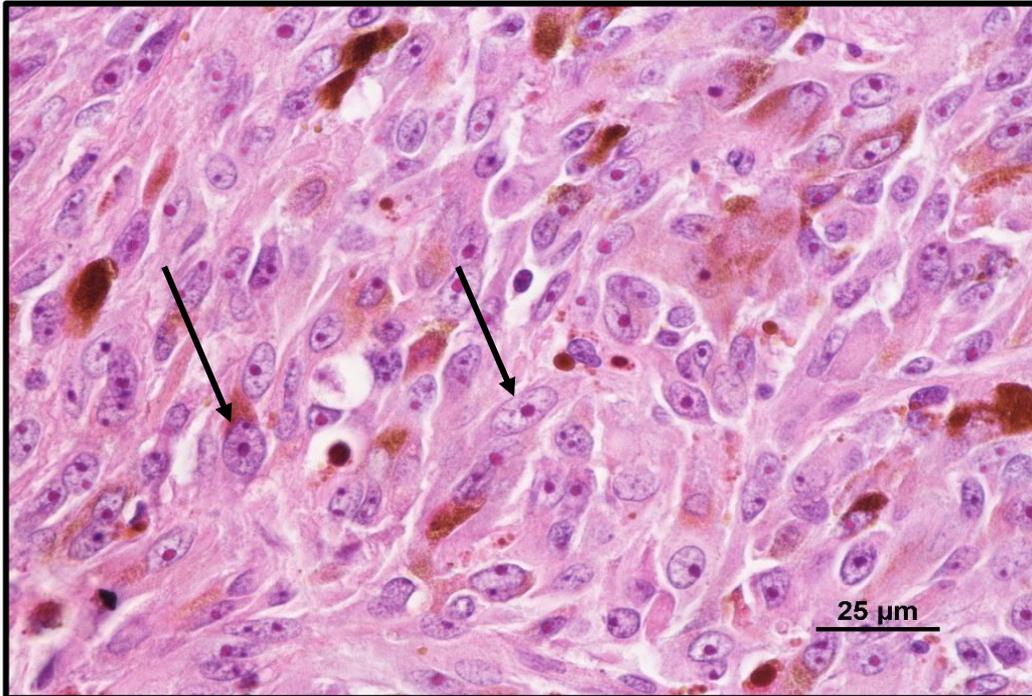


Figura 8 - Melanoma oral com acentuada atipia nuclear (grau 3). De notar nucléolos proeminentes (H&E).

Quanto ao tipo celular, em seis tumores as células eram fusiformes (40%), cinco tumores apresentavam células com morfologia variável, mista (33,3%) e quatro tumores células redondas (26,7%).

O infiltrado linfoplasmocitário (Fig.9), esteve presente em onze casos (77,3%), e ausente em quatro (26,7%), já a necrose esteve ausente em cinco casos (33,3%) e presente em dez (63,7%).

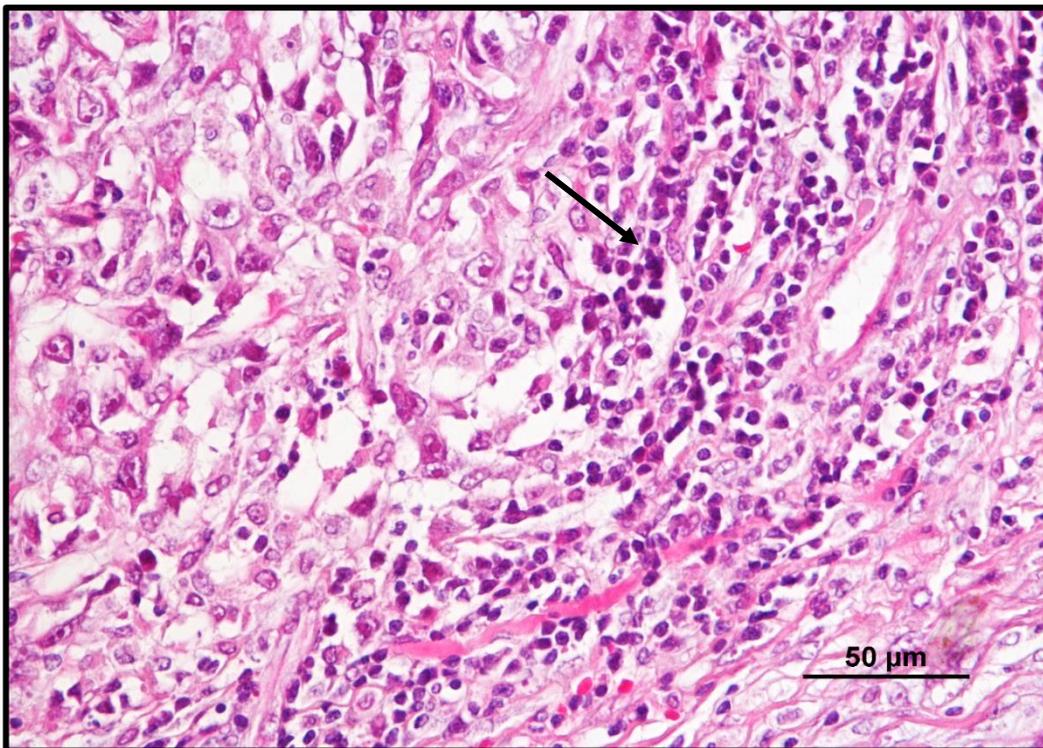


Figura 9 - Melanoma oral com infiltração linfoplasmocitária (H&E).

Não se observaram células gigantes em onze casos, (77,3%), apenas se tendo observado em quatro, (26,7%), em relação à ulceração esta esteve presente em todas as amostras (100 %).

Quanto á pigmentação, esteve ausente ou foi escassa em nove casos (60%), moderada em cinco casos (33,3%), e foi muito intensa num caso (6,7%), enquanto a presença de células tumorais intravasculares (CTI) (Fig.10), não foi observada em sete casos (46,7%) e esteve presente em oito casos (85,7%).

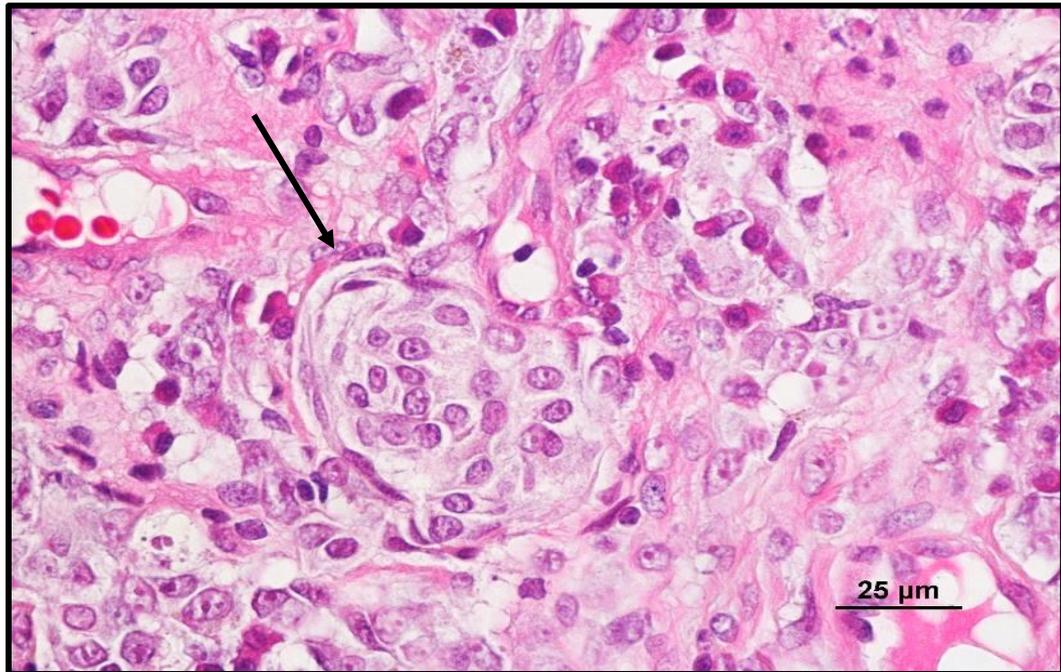


Figura 10 - Melanoma oral amelanico observando-se presença de células tumorais intravasculares (êmbolo), (H&E).

O estroma tumoral era na maioria dos casos escasso, mas estava presente em nove casos (n=60%).

As mitoses variaram entre 0,2 e 8,6 mitoses por campo de grande ampliação; 10 casos apresentaram um número de mitoses inferior ou igual a 2 e 5 casos um número de mitoses por campo de grande ampliação superior a 2.

Todos os parâmetros histopatológicos de natureza categórica que foram alvo de avaliação estão descritos no Quadro 8.

Quadro 8 - Características histopatológicas

Características histopatológicas		n	%
Atividade juncional	Presente	15	100
Grau de atipia nuclear	Grau 2-moderado	3	20
	Grau 3-acentuado	12	80
Tipo celular	Fusifforme	6	40
	Misto	5	33,3
	Redondo	4	26,7
Infiltração linfoplasmocitária	Ausente	4	26,7
	Presente	11	73,3
Necrose intratumoral	Ausente	5	33,3
	Presente	10	66,7
Células gigantes	Ausente	11	77,3
	Presente	4	26,7
Ulceração	Presente	15	100
Grau de pigmentação	Grau1-ausente	9	60,0
	Grau2-moderado	5	33,3
	Grau 3-acentuado	1	6,7
Células tumorais intravasculares	Ausente	7	46,7
	Presente	8	53,3
Quantidade de estroma	Grau 2-Escasso	9	60,0
	Grau 3-Moderado	6	40,0
Mitoses	1 (<3)	10	66,7
	2 (≥3)	5	33,3

n= número de amostra; std= desvio; padrão; p – significância estatística

15.6. Expressão imunohistoquímica da iNOS

A expressão imunohistoquímica da iNOS, observou-se no citoplasma das células tumorais com padrão granular ou difuso e ainda em macrófagos (controlo positivo interno). A imunorreatividade não foi uniforme em toda a preparação; verificando-se uma maior expressão nas áreas de crescimento infiltrativo.

Conforme o quadro 9, relativamente à intensidade da imunomarcação nos tumores positivos apenas quatro apresentaram uma intensidade fraca (26,7%), três casos apresentaram uma intensidade moderada (20%) e dois casos uma forte intensidade (13,3%) (Fig. 11).

Em relação à extensão da marcação, seis tumores (40%) foram negativos, tendo os nove positivos (n=60%) apresentado marcação ou positividade focal da iNOS. Destes, dois casos apresentaram positividade focal (13,3%), um caso positividade multifocal (6,7%) (Fig. 11) e seis casos positividade difusa (40%).(Fig. 12 e 13).

Quadro 9: Tabela relativa à intensidade e extensão da marcação

		n	%
Intensidade	0 Negativo	6	40,0
	1 Fraca	4	26,7
	2 Moderada	3	20,0
	3 Forte	2	13,3
Extensão	0 Negativo	6	40,0
	1 Focal	2	13,3
	2 Multifocal	1	6,7
	3 Difusa	6	40,0
Score	Negativo	6	40%
	Positivo	9	60%

n= número de amostra; std= desvio padrão;

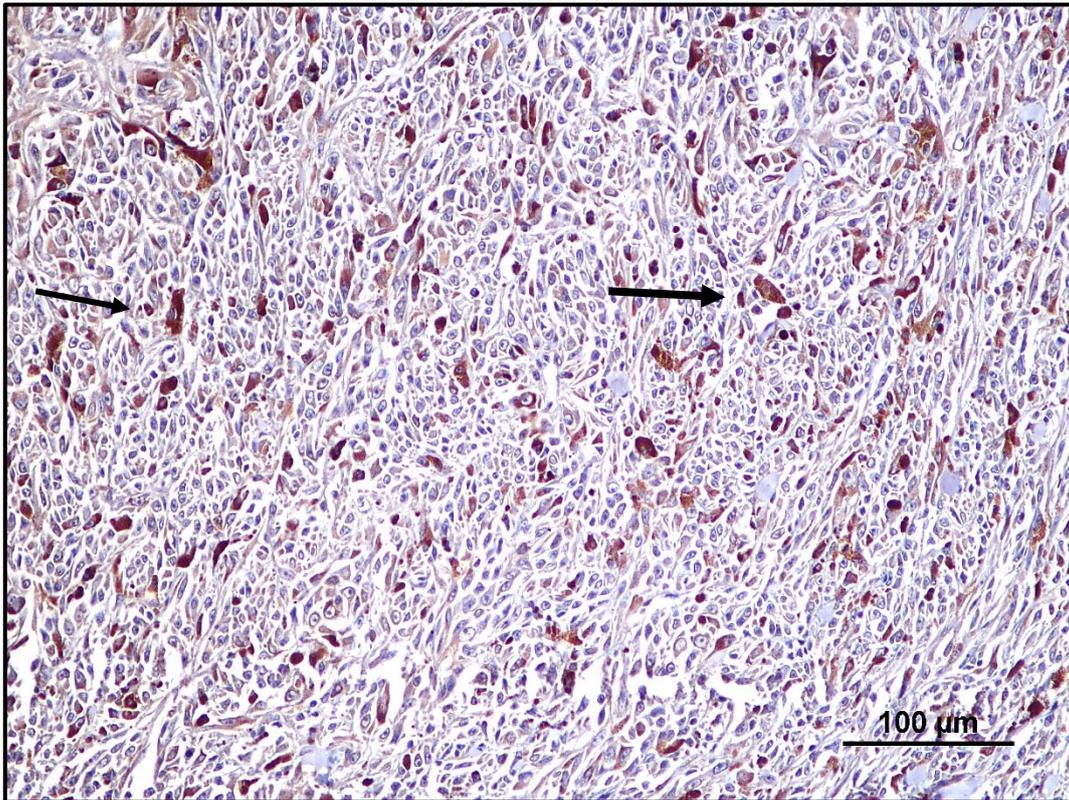


Figura 11 - Imunorreatividade para a iNOS em melanoma oral com extensão multifocal e intensidade forte de marcação.

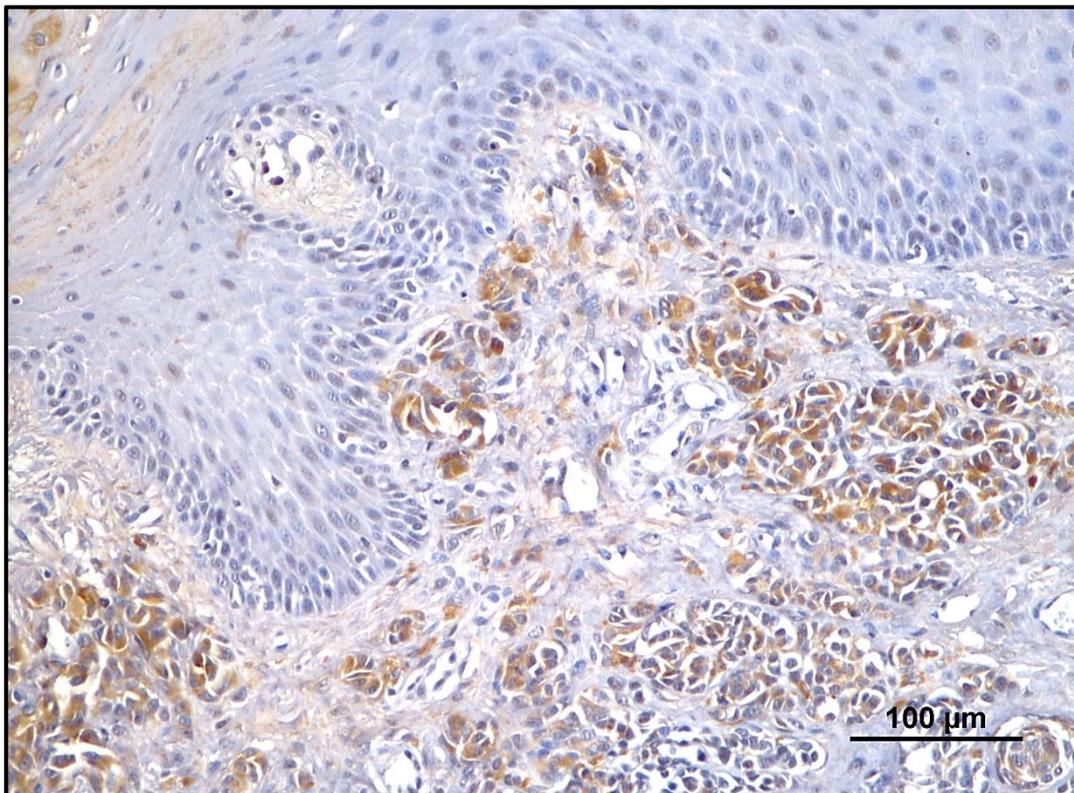


Figura 12 - Imunorreatividade para a iNOS em melanoma oral com extensão difusa e intensidade moderada de marcação das células tumorais.

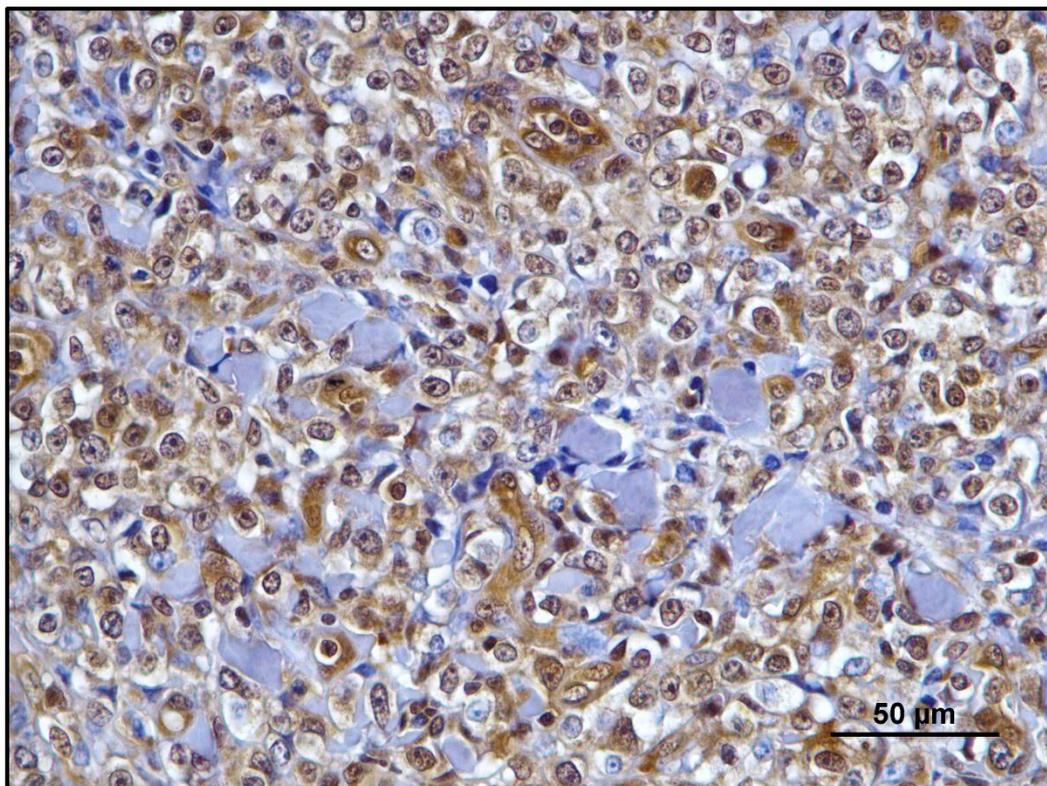


Figura 13 - Melanoma oral de células redondas com extensão difusa e intensidade forte de marcação das células tumorais.

15.7. Associação entre a imunexpressão da iNOS e as características histopatológicas

Como referido, os tumores foram agrupados em positivos e negativos (score de marcação) para a expressão da iNOS de modo a facilitar a análise estatística.

Da análise estatística, entre o score de imunorreatividade para a iNOS e as características histopatológicas observadas, observou-se associação estatisticamente significativa entre expressão da iNOS e o tipo celular ($p=0,047$). Dois tumores de células redondas apresentaram positividade, enquanto os tumores com células de morfologia mista foram em geral negativos para este biomarcador.

Observou-se ainda associação estatisticamente significativa entre a imunorreatividade para a iNOS e a atipia nuclear ($p=0,044$). Assim, os tumores com atipia moderada são todos negativos para a iNOS. Já a maioria dos tumores com elevada atipia são, em geral, positivos para a iNOS.

Da comparação dos restantes parâmetros, em função da iNOS, representada no Quadro 10, constatamos que não existem diferenças estatisticamente significativas em relação à associação da expressão da iNOS com as diferentes variáveis histopatológicas. De

referir, no entanto, que, quanto à existência de metástases, todos os tumores com presença de metástases foram positivos para a iNOS. Já no grupo de tumores sem metástases, 50% foram negativos e 50% positivos para a iNOS.

Quadro 10 - Associação entre a imunoposição de iNOS e as características histopatológicas

		Score iNOS				Total		p	
		Negativo		Positivo		n	%		
		n	%	n	%				
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	Atividade juncional	Presente	6	40,0	9	60,0	15	100	-
	Grau de atipia nuclear	Grau 1-escasso	3	20,0	0	0	3	20	0,044 significativo
		Grau 2-moderado	3	20,0	9	60,0	12	80	
		Grau 3-acentuado	6	40,0	9	60,0	15	100	
	Tipo celular	Fusiforme	2	13,3	13,3	26,7	6	40	0,047 significativo
		Misto	4	26,7	26,7	6,7	5	33,3	
		Redondo	0	0	0	26,7	4	26,7	
	Infiltração linfoplasmocitária	Ausente	2	13,3	2	13,3	4	26,7	0,1
		Presente	4	26,7	7	46,7	11	73,3	
	Necrose intratumoral	Ausente	1	6,7	4	26,7	33,3	5	0,58
Presente		5	33,3	5	33,3	10	66,7		
Células gigantes	Ausentes	5	33,3	6	40	11	73,3	0,60	
	Presente	1	6,7	3	20	4	26,7		
Ulceração	Presente	6	40	9	60	15	100	-	
	Grau 1-ausente	3	20	6	40	9	60		

Expressão imunohistoquímica da iNOS em melanomas orais de cães

Grau de pigmentação celular	Grau 2-moderado	2	13,3	3	20	5	33,3	0,4
	Grau3-acentuado	1	6,7	0	0	1	6,7	
Células tumorais intravasculares	Ausente	3	20	4	26,7	7	46,7	0,1
	Presente	3	20	5	33,3	8	53,3	
Quantidade de estroma	Grau 2-moderado	4	26,7	5	33,3	9	60	0,1
	Grau3-acentuado	2	13,3	4	26,7	6	40	
Índice mitótico	1 (<3)	4	26,7	6	40	10	66,7	0,1
	2 (≥3)	2	13,3	3	20	5	33,3	
Metástases	Ausente	6	40,0	6	40	12	80,0	0,16
	Presente	0	0,0	3	20	13	20,0	

n– número de amostra; std– desvio padrão; *p* – significância estatística

16. Discussão

Existem diferenças e semelhanças na história natural do melanoma em cães e humanos, no entanto é provável que dados clínicos e farmacológicos valiosos possam ser derivados de comparações entre as duas espécies (Grim *et al.*, 2008).

Posto isto, a presente revisão sistemática vem demonstrar que, para o melanoma oral, existem diversos fatores de prognósticos avaliados, com vista a dar uma resposta cada vez mais rápida e exata quanto ao tempo de sobrevida dos pacientes (Smedley, Spangler, *et al.*, 2011).

As formas mais agressivas localizam-se na cavidade oral. (Green *et al.*, 2013). Spangler & Kass, (2006) descreveram uma mortalidade de 68% em cães com melanoma na cavidade oral. A localização exerce uma influência direta sobre o prognóstico destes tumores (Spangler & Kass, 2006), estando os tumores localizados na cavidade oral, junções mucocutâneas e leito ungueal, associados a um alto grau de malignidade (Bergman *et al.*, 2003; Bergman *et al.*, 2006) e à diminuição da sobrevivência, quando comparamos com os localizados na derme, que apresentam um melhor prognóstico (Millanta *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002).

Neste estudo foi realizada a avaliação dos critérios histopatológicos e um estudo imunohistoquímico sobre a expressão da iNOS em tumores melanocíticos orais.

Camargo e os seus colaboradores (2008) apresentaram resultados contraditórios quando comparados com os resultados obtidos neste estudo, indicando uma maior prevalência de melanocitomas (67,2%) na espécie canina. No entanto, este estudo foi realizado apenas com neoplasias melanocíticas localizados sobre a pele e os dígitos, desprezando o local principal de desenvolvimento do melanoma, a mucosa oral.

De entre os tumores melanocíticos a taxa de metastização do melanoma é considerada elevada em comparação com outros tumores da cavidade oral. Segundo Braeuer *et al.*, 2013, este facto ocorre por alterações moleculares e genéticas durante o processo de metastização e que contribuem para o fenótipo maligno destas células tumorais.

Além das evidências clínicas, e características histopatológicas, os aspetos relacionados com a biologia dos tumores são considerados, no sentido de se prever o comportamento das lesões, independentes de qualquer tipo de procedimento adjuvante, bem como da sua resposta, a um determinado tipo de terapia, constituindo os chamados fatores de prognóstico (Wakamatsu *et al.*, 1995; Akrish *et al.*, 2004; Moura *et al.*, 2006).

Tendo em conta os resultados deste estudo, podemos afirmar que existiu uma maior incidência, na raça Cocker Spaniel, como descrito por (Modiano, 1999), que no entanto afirmou

que a predisposição racial ainda não está cientificamente comprovada. Já segundo Camargo (2005), e Perrone (2001), de acordo com a literatura mais recente existe uma maior predisposição na raça Schnauzer.

Quanto ao gênero, os nossos dados indicam uma maior incidência nos machos. Segundo um estudo de Teixeira *et al.*, (2010), que vai de encontro aos nossos dados, a incidência em machos é maior do que nas fêmeas, discordando de Mileer *et al.*, (2001), que afirma uma maior incidência em fêmeas.

Das nossas 15 amostras, 60% apresentavam localização mandibular, 33% maxilar e 6,7% tonsilar. Ausência de 80% de metástases, referindo que 20%, apresentavam uma localização pulmonar e linfonodos regionais.

Fonseca *et al.*, 2014, afirmam que na cavidade oral, a maior percentagem de melanomas tem localização na mandíbula, (42% a 63%) na região dos dentes molares, na maxila (15% a 33%), e menor percentagem na tonsila, o que permite suportar os nossos resultados.

Relativamente ao outro parâmetro em estudo, a idade, a incidência foi maior em animais com mais de 8 anos, como foi também descrito por Ramos-Vara e colaboradores (2000). A idade média registada foi também semelhante àquela encontrada na literatura, com uma média de idades a partir dos 8 anos (Liptak & Withrow, 2013; Boston *et al.*, 2014).

A nível histológico apenas uma pequena percentagem dos animais em estudo foi diagnosticada com melanoma amelanico, a qual foi inferior à descrita por Requicha (2010) de 26,9% e à de 33% descrita por Liptak & Withrow (2013) e Biller *et al.* (2016).

O facto de alguns dos tumores orais não permitirem um diagnóstico definitivo apenas com base no exame citológico e/ou histológico tradicional, como é o caso de alguns melanomas amelanicos, obriga a que a amostra seja sujeita a imunohistoquímica para descartar possíveis diagnósticos diferenciais.

Quanto ao tipo celular, os melanomas de tipo fusiforme apresentaram a maior percentagem, 40%, tendo o misto apresentado 33,3% e o redondo 26,7%. Os dados não vão de encontro aos estudos de Millanta *et al.*, (2002) e Spangler & Kass, (2006), que reportam uma prevalência de melanomas tipo redondo em cães de 31% e 65,7% respetivamente.

De acordo com Modiano (1999), o tipo histológico isoladamente não se pode levar em consideração para avaliar o grau de agressividade entre os melanomas.

O Infiltrado linfoplasmocitário e a necrose estiveram presentes na maioria dos melanomas orais. Spangler & Kass (2006) associam a inflamação profunda e a necrose à malignidade do tumor.

A ulceração esteve presente em 100% dos casos, Como refere Gross *et al.* (2005), a ulceração é frequente nos melanomas orais.

A presença de mais de 50% de células tumorais intravasculares, demonstra uma característica exclusivamente dos tumores malignos, uma vez que uma das evidências de um elevado grau de malignidade é a invasão dos vasos linfáticos ou pequenos vasos sanguíneos (Goldschmidt *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1997).

O estroma foi maioritariamente de grau 2 correspondente a escasso (60%), De acordo com Gross *et al.* 2005 os tumores com morfologia celular predominantemente epitelióide, o que não se verificou no nosso estudo, sendo na maioria fusiforme, apresentam, em geral, maior quantidade de estroma.

Dois dos critérios histológicos com maior valor preditivo do grau de malignidade em cães com melanoma oral baseiam-se na determinação da proliferação tumoral através de marcadores celulares endógenos de proliferação como o índice mitótico e marcadores de proliferação celular (Ramos-Vara *et al.*, 2000), (Bergin, Smedley, Esplin, Spangler & Kuipel, 2011), (Bergman *et al.*, 2013). No nosso caso foi estimada pela contabilização do índice mitótico.

Para Dubielzig *et al.*, (2010), a presença de mitoses já é indicativo de melanoma. Segundo De Jong *et al.*, (2000), um elevado número de mitoses associado a uma elevada percentagem de proliferação celular, apresentam um prognóstico mais desfavorável.

O índice mitótico, apresentou-se com uma marcação fraca, de acordo com Vail e Withrow (2007) e diversos outros autores, uma taxa mitótica de menos de três figuras mitóticas por 10 campos está associada à presença de tumores benignos. Ainda, para Vail e Withrow (2007), melanomas altamente proliferativos, com altos índices mitóticos que são muito infiltrativos das estruturas subjacentes representam uma forma mais agressiva.

Em 1987, demonstrou-se que as células dos mamíferos possuem a capacidade de sintetizar óxido nítrico (ON), ou monóxido de azoto, o que despertou interesse na comunidade científica. Devido ao curto tempo de vida do ON, a sintetase do óxido nítrico é frequentemente utilizada como indicador dos níveis de ON. A iNOS é considerada um biomarcador de fenótipos tumorais mais agressivos, relevante para o prognóstico. Pensa-se que a sua regulação poderá estar intimamente associada ao microambiente tumoral com destaque para as citocinas, hipoxia, privação de nutrientes e vários fatores metabólicos (Heinecke *et al.*, 2014).

O ON produzido pela iNOS difunde-se para fora dos macrófagos e invade a células alvo destruindo-as, através da inibição de centros Fe-S de enzimas envolvidas na respiração celular (Queiroz & Batista, 1998) e inibindo a replicação do DNA (Wink *et al.*, 1998). O desenvolvimento do tumor, a sua vascularização e o seu potencial invasivo estão relacionados com reduzidas concentrações de ON produzidas pelas células tumorais (Jenkins *et al.*, 1995). A regulação positiva desta enzima está associada à progressão tumoral (Daniela M., *et al.* 2001).

No nosso estudo, estudámos a expressão da iNOS em melanomas orais com o objetivo de compreender a sua expressão nestes tumores e relacionar com as características histopatológicas classicamente associadas à agressividade tumoral.

A expressão imunohistoquímica da iNOS, verificou-se no citoplasma das células tumorais com padrão granular ou difuso e ainda em macrófagos (controlo positivo interno). A imunorreatividade não foi uniforme em toda a preparação; verificando-se uma maior expressão nas áreas de crescimento infiltrativo, o que poderá sugerir uma maior expressão de iNOS nas células com fenótipo invasor.

Em relação à extensão de marcação, seis tumores (40%) apresentaram extensão difusa, dois casos (13,3%) apresentaram positividade focal, tiveram marcação ou tiveram uma positividade focal da iNOS e um caso apresentou positividade multifocal (6,7%).

Relativamente à intensidade da imunomarcação nos tumores positivos 4 casos apresentaram uma intensidade fraca (26,7%), 3 casos intensidade moderada (20%) e 2 casos forte intensidade (13,3%).

Da análise estatística, entre o score de imunorreatividade para a iNOS e as características histopatológicas observadas, observou-se associação estatisticamente significativa entre expressão de iNOS e o tipo celular ($p=0,047$), como já atrás referido, a maior percentagem (40%) de positividade para iNOS foi para os tumores de tipo celular fusiforme.

Observa-se ainda associação estatisticamente significativa entre a imunorreatividade para a iNOS e a atipia nuclear ($p=0,044$). Os tumores com atipia moderada são todos negativos para a iNOS. Já a maioria dos tumores com elevada atipia são, em geral, positivos para a iNOS. A atipia nuclear tem sido correlacionada com a malignidade e agressividade nos tumores melanocíticos caninos (Smedley *et al.*, (2001b),

Spangler e Kass, 2006). Assim, a expressão de iNOS poderá estar associada uma maior agressividade tumoral.

Os nossos dados estão de acordo com outros estudos.

Greene e colaboradores (2013), concluíram que os melanomas de canídeos que produzem menos iNOS, são tumores menos agressivos. Em humanos, uma alta expressão da iNOS, está associada a uma percentagem pequena de sobrevivência do paciente (Ekmekcioglu S *et al.*, 2006).

Segundo Isaac *et al.*, (2012), níveis elevados de ON e de iNOS encontrados no microambiente tumoral são características importantes para a progressão desta lesão, o óxido nítrico é produzido em níveis nanomolares pelas células do melanoma, onde ativa as vias de promoção do crescimento (Grimm EA *et al.*, 2008)

Apesar de não ter existido associação entre a expressão da iNOS e a metastização,

todos os tumores com presença de metástase, aquando do diagnóstico, foram positivos para este biomarcador. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos semelhantes realizados em melanomas humanos onde pacientes humanos cujos linfonodos contêm células tumorais expressando altos níveis de iNOS têm sobrevida significativamente menor. (Ekmekcioglu S *et al.*, 2006).

Para realizar estudos de sobrevida, e melhor interpretação de resultados impunha-se uma maior casuística, e também a existência de mais estudos publicados, pois de momento só existem dois estudos acerca da atividade da iNOS em melanomas orais em cães o que dificultou a interpretação dos resultados com vista a que se perceba o papel da iNOS no melanoma oral.

17. Conclusão

Na amostra estudada, observámos relativamente à incidência de melanomas, diferenças quanto à raça, género e idade. Os tumores estudados foram encontrados sobretudo em animais da raça Cocker Spaniel, do género masculino e em animais geriátricos, com uma idade superior a oito anos. A localização com maior incidência foi a mandíbula.

A maioria dos tumores estudados expressou imunorreatividade para a iNOS nas características histopatológicas observadas, no entanto a imunorreatividade não foi uniforme em toda a preparação, verificando-se uma maior expressão nas áreas de crescimento infiltrativo. A expressão imunohistoquímica da iNOS, observou-se no citoplasma das células tumorais com padrão granular ou difuso e ainda em macrófagos (controlo positivo interno).

O índice mitótico evidenciou fraca marcação, a intensidade da imunomarcação foi considerada fraca nos melanomas, e em relação à extensão da marcação, a maior percentagem de tumores obteve uma positividade difusa da iNOS.

Observou-se associação estatisticamente significativa entre a expressão da iNOS e o tipo celular ($p=0,047$), sendo o tipo fusiforme positivo para iNOS, e também entre a expressão da iNOS e a atipia nuclear ($p=0,044$), estando a elevada atipia (grau 3) associada a um mau prognóstico.

Os tumores com uma morfologia mista são, em geral, negativos para este biomarcador.

De referir, no entanto, que, quanto à existência de metástases, todos os tumores com presença de metástases foram positivos para a iNOS, já nos tumores sem metástases, apenas 50% foram positivos para a iNOS.

Em relação aos restantes parâmetros analisados constatámos que não existem diferenças estatisticamente significativas em relação à expressão da iNOS nas diferentes variáveis histopatológicas.

A partir da revisão de literatura sobre neoplasias orais malignas conclui-se que, apesar da existência de vários estudos nesta área, mais investigação deve ser realizada a respeito desta neoplasia em cães, para que com o novo conhecimento obtido seja possível desenvolver estratégias inovadoras no que concerne à prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico dos melanomas.

A maioria dos aspetos encontrados na investigação relatada neste trabalho foi condizente com as citações da literatura.

18. Anexos

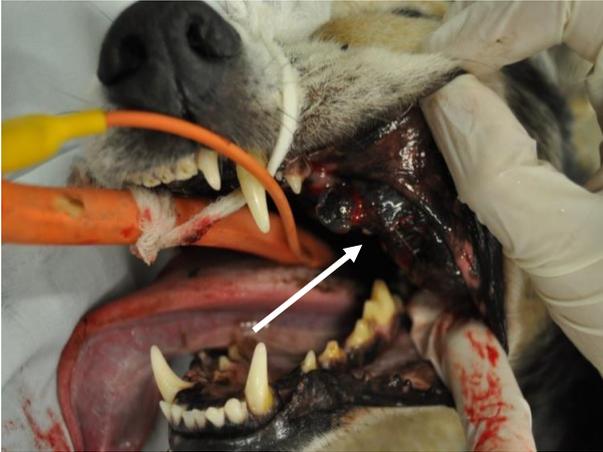


Figura 3

Melanoma oral num cão de raça indeterminada (seta).

Foto amavelmente cedida pelo Dr. Marco Gioso, USP - São Paulo

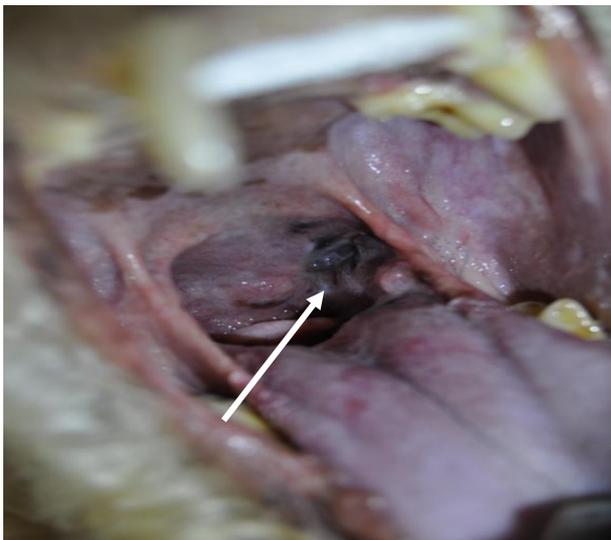


Figura 4

Melanoma tonsilar em cão de raça Caniche.

Foto amavelmente cedida pelo Dr. Marco Gioso, USP - São Paulo



Figura 5

Melanoma com localização maxilar em cão de raça Caniche.

Foto amavelmente cedida pelo Dr. Marco Gioso, USP - São Paulo

19. Referências bibliográficas

- ✓ Akrish, S., Buchner, A., Dayan, D. (2004). *Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation*. Refuat Happen Vehashinayan. 21 (4), 6-15, 93.
- ✓ Alexander, A.N., Huelsmeyer, M.K., Mitzey, A., Dubielzig, R.R., Kurzman, ID., MacEwen, E.G., Vail, D.M. (2006). *Development of an allogeneic whole-cell tumor vaccine expressing xenogeneic gp100 and its implementation in a phase II clinical trial in canine patients with malignant melanoma*. Cancer Immunology Immunotherapy. 55, 433-42.
- ✓ Alonso, S.R., Ortiz, P., Pollan, M. et al. (2004). *Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles*. Am J Pathology. 164(1), 193-203.
- ✓ Ameerally, P.J., Colverg, G.B. (2007). *Cutaneous cryotherapy in maxillofacial surgery*. J.Oral Maxillofacial Surgery. 65, 1785-92.
- ✓ Arenas C, Peña L, Granados-Soler JL et al. 2016. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case–control prospective study. *The Veterinary Record*. 179(5):125.
- ✓ Argyle, D. (2003). *The molecular biology of cancer In Dobson, J. M. & Lascelles, B.D.X., BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. 2ªed, British Small Animal Veterinary Association, India, 1-9.
- ✓ Argyle, D.J., & Khanna. (2007). *C. Tumor biology and metastasis In Withrow, S. J. & MacEwen's, E. G., Small Animal Clinical Oncology*. 4ªed, Saunders Elsevier, United States of America, 31-53.
- ✓ Baba, A.L. Cătoi. (2007). *C. Comparative oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy. Bucharest. (1).
- ✓ Bagley, R.S. (2005) *Multifocal Neurological Diseases*. In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ªed, Elsevier Saunders Philadelphia, 836-842.
- ✓ Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, JE et al. (2001), *Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system*. J Clinic Oncology. 19, 3622-34.
- ✓ Banerjee, S., Harris, M. (2000), *Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma Histopathology*, 36, n.5, 387-402.
- ✓ Batista, WL., Ogata, FT., Curcio MF., Miguel RB., Arai RJ. et al (2013). *S-Nitrosoglutathione and Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide Regulate Compartmentalized Ras S-Nitrosylation and Stimulate. Cell Proliferation - Antioxid Redox Signal*.
- ✓ Bedrosian, I., Faries, M.B., Guerry, D. et al. (2000). *Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma (< or = 1 mm) with vertical growth phase*. Ann Surgery Oncology. 7, 262-7.

- ✓ Bellows, J. (2004). *Oral surgical equipment, materials, and techniques*. In: Bellows J, ed. *Small Animal Dental Equipment, Materials, and Techniques*, 1ªed. Blackwell Publishing Oxford, Reino Unido. 297-362.
- ✓ Bennett, D. (1993) *C Genetics, development and malignancy of melanocytes*. *Int.Rev.Cytology*. 146, 191-260.
- ✓ Bergman, P.J. (2007) *Canine Oral Melanoma*. *Clinical Tech Small Animal Practice*. 22, 55-60.
- ✓ Bergman, P.J., Camps-Palau, MA., McKnight, JA., Leibman, NF., Craft, DM., Leung, C., Liao, J., Riviere, I., Sadelain, M., Hohenhaus, A.E., Gregor, P., Houghton, A.N., Perales, M.A., Wolchok, JD. (2006) *Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center*. *Vaccine*. 24, 4582-85.
- ✓ Bergman, P. J. & Wolchok, J. D. (2008). *Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma*. *Cancer Therapy*. 6, 817-826.
- ✓ Bergman, P. J., Kent, M. S. & Farese, J. P. (2013). *Melanoma*. In S. J. Withrow, D. M Vail & R. L. Page, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. (5th Ed.). Elsevier/Saunders St. Louis, Missouri. 321-334.
- ✓ Bergin, I. L., Smedley, R. C., Esplin, D. G., Spangler, W. L. & Kiupel, M. (2011). *Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma*. *Veterinary Pathology*. 48, 41-53.
- ✓ Bertone, E.R., Snyder, L. A., Moore, A. S. (2003) *“Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats.”* *J Vet. Int. Med.* 17(4), 557-562.
- ✓ Bhang, DH., Choi, US., Kim, MK., Choi, EH., Kang, MS., Hwang, CY., Kim, DY., Youn, HY., Lee CW. (2006). *Epitheliotropic cutaneous lymphoma (mycosis fungoid) in a dog*. *Journal of Veterinary Science*. 7(1), 97–99.
- ✓ Biller, B., Berg, J., Garrett, L., Ruslander, D., Wearing, R., Abbott, B., Patel, M., Smith, D. & Bryan, C. AAHA. (2016). *Oncology Guidelines for Dogs and Cats*. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 52 (4), 181-204.
- ✓ Birchard, S. (1996). *Surgical management of neoplasms of the oral cavity in dogs and cats*. In: *Proceedings of the 20th Waltham/OSU Symposium*. Ohio, EUA.
- ✓ Blackwood, L., J.M. Dobson. (1996). *Radiotherapy of oral malignant melanomas in dogs*. *J Am Vet Association*. 209.
- ✓ Boston, S.E., Lu, X., Culp, W.T. N., Montinaro, V., Romanelli, G., Dudley, R.M., Liptak, J.M., Mestrinho, L. & Buracco, P. (2014). *Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas. 151 cases (2001–2012)*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 245 (4), 401-407.
- ✓ Braeuer, R. B., Watson, I. R., Wu, C. J., Mobley, A. K., Kamiya, T., Shoshan, E. & Bar-Eli, M. (2013). *Why is melanoma so metastatic? Pigment cell and melanoma research*. 27 (1), 19- 36.

- ✓ Brockley, L.K., Cooper, M.A. & Bennett, P.F.).(2013). *Malignant melanoma in 63 dogs (2001–2011): the effect of carboplatin chemotherapy on survival*. New Zealand veterinary journal. 61, 25-31.
- ✓ Brockus, CW., Myers RK. (2004). *Multifocal rhabdomyosarcomas within the tongue and oral cavity of a dog*. Veterinary Pathology. 41, 273-274.
- ✓ Brochez, L., e J. M. Naeyaert. (2000) “*Serological markers for melanoma.*” *British Journal of Dermatology*. 143, 256-268.
- ✓ Brønden, L. B., Eriksen, T., & Kristensen, A. T. (2009) *Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasms in Danish dogs--data from the Danish Veterinary Cancer Registry*. Acta Veterinaria Scandinavica. 51,54.
- ✓ Busam, KJ. (2004). *The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours*. Pathology. 36(5), 462-9.
- ✓ Bussanich, N.M., Dolman, P.J., Rootman, J., Dolman, C.L. (1987). *Canine uveal melanomas: series and literature review*. Journal of American animal hospital Association. 23, 4, 15-422.
- ✓ Buttery, L.D.K. et al. (1993). *Induction of nitric oxide synthase in the neo-vasculature of experimental tumors in mice*. Journal Pathology. 171, 311-19.
- ✓ Cangul, I.T. (2001) *Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours*. Veterinary Science. 4, 1-19.
- ✓ Camargo, L.P. (2005). *Neoplasia melanocítica cutânea em cães: aspetos clínicos e histopatológicos em 58 casos*. Tese de doutoramento. Universidade Federal de Viçosa Minas gera.
- ✓ Camargo, L.P., Conceição, L.G., Costa, P.R.S. (2008). *Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004)*. Brazilian Journal of veterinary research and animal science. 45, 138,158.
- ✓ Carlson, J.A., Ross, J.S., Slominski, AJ. (2009). *New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma*. Clinical Dermatology. 27(1), 75-102.
- ✓ Castejón, A. (2002). *Calcifying epithelial odontogenic tumor in a dog*. In: Proceedings of the 11th EVDS Congress. Granada, Espanha.
- ✓ Chandrasekharan, N.V., & Simmons LD. (2004). *The cyclooxygenases*. Genome Biology. 5: 241.
- ✓ Chan JKC, El-Naggar AK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. World Health Organization, 4th edition; 2017.
- ✓ Chua, K.J., Chou, SK., Ho, JC. (2007). *An analytical study on the thermal effects of cryosurgery on selective cell destruction*. J Biomech. 40: 100-16.
- ✓ Clark, WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. (1969). *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res. 29, 705-27.

- ✓ Clark, WH, Jr., Elder, DE, Guerry D *et al.* (1989). *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression.* J Natl Cancer Institute. 81, 1893-904.
- ✓ Clemente, C.G., Mihm, MC., Jr., Bufalino, R., Zurrada, S., Collini, P., Cascinelli, N. (1996). *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma.* Cancer. 77, 1303-10.
- ✓ Cook, M.G., Spatz, A., Brocker, E.B., Ruitter, DJ. (2002). *Identification of histological features associated with metastatic potential in thin (<1.0 mm) cutaneous melanoma with metastases.* A study on behalf of the EORTC Melanoma Group. J Pathology. 197, 188-93.
- ✓ Coyle, V.J., Garret L.D. (2009). “*Finding and treating oral melanoma, squamous cell carcinoma, and fibrosarcoma in dogs.*” Vet Med. 11(66), 74-81.
- ✓ Cunha, S.C.S. *et al.* (2013). *A utilização da radioterapia como terapia adjuvante no tratamento do melanoma oral em um cão.* Acta Scientiae Veterinariae, Disponível em <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289031818006>.
- ✓ Cullen, J.M., Page, R. & Misdorp, W. (2002). *An overview of cancer pathogenesis, diagnosis, and management In Meuten, D. J. Tumors in domestic animals.* (4th ed.). A Blackwell Publishing Company United State of America: Iowa State Press. 3-45.
- ✓ Dabbs, D.J. (2002). *Diagnostic immunohistochemistry.* Philadelphia: Churchill Livingstone.
- ✓ Massi, D., Franchi, A., Sardi, I., Magneli, L., Paglierani, L., Borgognoni.L., Reali, U.M., Santucci, M. (2001). *Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions.* Journal of Pathology. 194.
- ✓ Dennis, M.M., Ehrhart, N., Duncan, C. G., Barnes, A. B., Ehrhart, E. J. (2006). “*Frequency of risk factors associated with lingual lesions in dogs: 1196 cases (1995-2004)*” J Am Vet Med Association. 228(10): 1533-1537.
- ✓ Donald, M. (2016). *Tumors in Domestic Animals* (5a Edição). C: Wiley Blackwell.
- ✓ De Jong, J.S., Van Dest, P.J., Baak, J.P.A (2000). *Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer.* British Journal of cancer. 82, 368-372.
- ✓ DiBernardi, L., Dore, M., Davis, J. A., Owens, J. G., Mohammed, S. I., Gupta, C. F., Knapp, D. W. (2007). “*Study of feline oral squamous cell carcinoma: potential target for cyclooxygenase inhibitor treatment.*” Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 76(4), 245-50.
- ✓ Dobson, J. M. & Lascelles, B.D.X. (2003). *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology.* (2ª ed.), British Small Animal Veterinary Association. India.
- ✓ Donato, R. (2007) “*Rage: a single receptor for several ligands and different cellular responses: the case of certain S100 proteins.*” *Curr Mol Med* 7. 8 , 711–724.
- ✓ Dubielzig, R.R., Ketring, K.L., MacLellan, G.J., Albert, D.M. (2010). *Veterinary pathology: comparative Review.* 1ed, Saunders. Philadelphia. 472.

- ✓ Espey, M. G. K. M. Miranda, D. D., Thomas, S., Xavier, D. Citrin., *et al* (2002). *A chemical perspective on the interplay between NO, reactive oxygen species, and reactive nitrogen oxide species*. Annals of the New York Academy of Sciences. 962, 195-206.
- ✓ Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J.A., Prieto, VG. *et al.* (2006). Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. Int J Cancer. [PubMed: 16557582].119, 861–866.
- ✓ Eurides, D., Daleck, C.R., Silva, L.A.F., Silva, M.S.B (2010). *Criocirurgia*. In: Daleck, C.R. DE Nardi, A.B. Rodaski, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo. 612.
- ✓ Ferreira, C.M.M., Maceira, J.M.P., Coelho, J.M.C.O, (1997). *Análise imunohistopatológica clínica e evolutiva de melanomas*. Rio de Janeiro.72, 117-126.
- ✓ Ferro, D.G., Lopes, FM., MAFA, Venturini., Correa, HL, Gioso, M.A. (2004). *Prevalência de neoplasias da cavidade oral de cães atendidos no Centro Odontológico Odontovet entre 1994 e 2003*. Arquivo de Ciências Veterinárias e Zootecia da UNIPAR.7 (2),123-128.
- ✓ Fidler, I.J. (1989). *Origin and Biology of Cancer Metastasis, Cytometry*. 10, 673-680.
- ✓ Figueiredo, L.C., Cordeiro, L.N.,Arruda, A.P., Carvalho, M.D.F.,Ribeiro, D.M Coutinho, H.D.M. (2003). *Cancro de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma*. Revista brasileira cancerologia.
- ✓ Fonseca, A.K.S. *et al.* (2014). Hemimaxilectomia caudal em cão com melanoma amelanocítico – relato do caso. XXIII Congresso de Pós-Graduação da UFLA.
- ✓ Fossum, T. W. (2008). *Cirurgia de pequenos animais*. 3ª ed, Elsevier, São Paulo.
- ✓ Frahm, SO., Schubert, C., Parwaresch, R., Rudolph P. (2001). *High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas*. Hum Pathology. 32, 1376.
- ✓ Freeman, K.P., Hahn, K.A., Dee-Harris, F. & King, G.K. (2003). *Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987-1997)*. Journal of veterinary internal medicine of the American College of Veterinary Internal Medicine. 17, 96-101.
- ✓ Fukumaru, K., Yoshii, N., Kanzaki T. *et al.* (2007). *Immunohistochemical comparison of B- catenin expression by human normal epidermis and epidermal tumors*. Journal Dermatology. 34:746-753.
- ✓ Gardner, DG. (1996) *Epúlide in the dog: a review*. Journal of Oral Pathology and Medicine. 25,32-37.
- ✓ Garma –Aviña, A., Valli, V.E e Lumsden, J.H. (1981). *Cutaneous melanomas in domestic animals*. Journal of Cutaneous Pathology. 8, 3-24.
- ✓ Ginn, P.E., Mansel, J.E.K.L., Rakich, P.M. (2007). *Skin and appendages*. In: Maxie MG & Jubb KVF eds. Jubb, Kennedy, and Palmer’s Pathology of domestic animals. 5ª ed. Elsevier -Health Sciences Division. 599, 759-61.
- ✓ Goldschmidt, M.H., Dunstan, R.W., Stannerd, A.A., von Tscharner C, Walder E.J, Yaeger J.A. (1998). *Histological Classification of Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin*

- of Domestic Animals. In: WHO International Classification of Tumors of Domestic Animals. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology. 38-40.
- ✓ Goldschmidt, M. H., & Goldschmidt, K. H. (2016). Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In *Tumors in Domestic Animals* (5ª Edição, pp. 129–131). Iowa: Wiley Blackwell.
 - ✓ Goldschmidt, M, Hendrick (2002). *Tumors of the skin and soft tissues* In: Meuten, D.J. Tumors in domestic animals, 4ªed. Blackwell publishing, Iowa, 95-96.
 - ✓ Gorlin, R.J., Chaudhry, AP., Pindborg, JJ. (1960). *Odontogenic tumors: classification, histopathology, and clinical behavior in man and domesticated animals*. *Cancer*.14, 73-101.
 - ✓ Gorlin, RJ. (1963). *Odontogenic tumors in man and animals pathological classification and clinical behaviour: a review*. *Annals New York Academy of Sciences*. 108, 722-771.
 - ✓ Graf, R., Grüntzig, K., Hässig, M., Axhausen, K. W., Fabrikant, S., Welle, M., Pospischil, A. (2015). Swiss Feline Cancer Registry: A Retrospective Study of the Occurrence of Tumours in Cats in Switzerland from 1965 to 2008. *Journal of Comparative Pathology*. 153(4), 266–277.
 - ✓ Greene, G.W., Hayres, J.W., Dozier, M., Blumberg, JM., Bernier, JL. (2013). *Primary malignant melanoma of the oral cavity*.
 - ✓ Greene, V.R. et al. (2013). *Expression of Leptin and iNOS in Oral Melanomas in Dogs*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 27:1278-1282.
 - ✓ Grimm, E.A., Ellerhorst, J., Tang, CH., Ekmekcioglu. (2008). *S. Constitutive intracellular production of iNOS and NO in human melanoma: possible role in regulation of growth and resistance to apoptosis*. *Nitric Oxide*. [PubMed: 18472017]. 19,133–137.
 - ✓ Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J., Affolter, V.K. (2005). Melanocytic Tumors. In: *Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. 2ªed. Wiley-Blackwell. 813-33.
 - ✓ Gown, A.M., Vogel, AM., Hoak, D., Gough, F., McNutt, M.A. (1986). *Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes*. *Am J Pathology*. 123(2), 195–203.
 - ✓ Gualandri, L., Betti, R., Crosti, C. (2008). *Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship between histologic subtypes and diagnostic delay*. *European academy of Dermatology and venereology*. 23,283-287.
 - ✓ Haass, N.K., Amalley, K.S.M., Li, L., Herlyn, M. (2005). Adhesion migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment cell Research*.18, 150-159.
 - ✓ Haass, N.K., Wladykowski, E., Kief, s., Moll, I., Brande, J. (2006) *Differential induction of connexins 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis and cytochemistry*. 54,171-182.

- ✓ Hahn, K.A., DeNicola, D.B., Richardson, R.C. & Hahn, E.A. (1994). *Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. Journal of Small Animal Practice.* 35, 251-256.
- ✓ Heinecke, J. L. L. A., Ridnour, R. Y. S., Cheng, C. H., Switzer, M., M. Lizardo, *et al.* (2014). *Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression.* USA 111(17), 6323-6328.
- ✓ Haines, D.M., & West, K.H. (2005). Immunohistochemistry: forging the links between immunology and pathology. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 108, 151-156.
- ✓ Hansen, K., Khanna, C. (2004). "Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development." *Eur J Cancer.* 40(6), 858-880.
- ✓ Head, K.W., Cullen, JM., Dubielzig, R.R., Else, R.W., Misdorp, W., Patnaik, AK, Tateyama S., Gaag I. (2003). *Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals.* In: WHO, International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, 2ªed. EUA: Armed Forces Institute of Pathology. Washington. 10, 27-57.
- ✓ Head, K. ., Else, R. ., & Dubielzig, R. (2016). Tumors of the Alimentary Trac. In *Tumors in Domestic Animals* (5a Edição, pp. 426 – 430). Iowa: Wiley Blackwell.
- ✓ Henry, C. J. M. L., Higginbotham (2010). "Tumors of the head and Neck." In: *CANCER Management in Small Animal Practice*, por C. J. Henry, & M. L. Higginbotham,. Saunders Elsevier, Maryland Heights, Missouri. 195-203.
- ✓ Hazan, C., Melzer, K., Panageas, K.S. *et al.* (2002). *Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma.* *Cancer.* 95, 634.
- ✓ Hernberg, M., Turunen, J.P., Muhonen, T., Pyrhonen, S. (1997). *Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy.* *J Immunother.* 20, 488-95.
- ✓ Hoffmann, N.E., Blschof, J.C. (2004). The cryobiology of cryosurgical injury. In: Lucas, R. *Monitoração e Mensuração Tomográfica de Diferentes Técnicas de Crioterapia em Pele de Cães da Raça Beagle, e sua Relação com as Medidas de Necrose Estimadas pela Histopatologia.* São Paulo. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.102.
- ✓ Howard, PE. (2002). *Neoplasias del maxilar y la mandíbula.* In: Birchard SJ, Sherding RG, eds. *Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies.* Madrid, Espanha: McGraw Hill. 2, 257-1265.
- ✓ Hsu, Mei Yu., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J.L., Herlyn, M. (2000). *Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression.* *Journal of Cell Science.* 113, 1535-1542.
- ✓ Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks." 88, 333-346.
- ✓ Ishikawa, T., Yamamoto H. (1996). *Case of calcifying epithelial odontogenic tumors in a dog.* *Journal of Small Animal Practice.* 37, 597-599.

- ✓ Jenkins, D.C., Charles, I.G.; Thomsen, I.I. (1995). *Roles of nitric oxide in tumor growth*. Proceedings of the National Academy Sciences. 92, 4392-4396.
- ✓ Jones, T.C., Hunt, RD., King NW. (1997). *Mineral deposits and pigments*. In: *Veterinary pathology*. 6ª ed. Wiley-Blackwell. 66-67, 856-58.
- ✓ Jones, J.C. Neuroimaging. In C.H. (2004). Vite (Ed.). *Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment*.
- ✓ Jungbluth, A.A., Busam, K.J., Gerald, W.L. et al. (1998). *A103: an anti-Melan-A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues*. Am J Surgical Pathology. 22, 595- 602.
- ✓ Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). *Pele e anexos*. In: *Histologia Básica*. (10ªed.). 359- 364.
- ✓ Kafka, U.C.M., Carstens, A., Steenkamp, G., Symington, H. (2004). *Diagnostic value of magnetic resonance imaging and computed tomography for oral masses in dogs*. Journal of the South Africa veterinary association. 75, 4, 163-168.
- ✓ Kemper, G. O., Carvalho, S. M., Trapp, W., Okano, F., N, Padilha. (2012). *Melanoma oral em cão. Relato de três casos [Oral melanoma in dog. Report of three cases]*.
- ✓ Kesmodel, SB., Karakousis, G.C., Botbyl, J.D. et al. (2005). *Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas*. Surgery Oncology. 12, 449-58.
- ✓ Kirkham, N., Cotton, D.W. (1984). *Measuring melanomas: the Vernier method*. J Clinic Pathology. 37, 229-30.
- ✓ Kraft, S.L. & Gavin, P.R. (1999). *Intracranial neoplasia*. Clinical Techniques in Small Animal Practice. 14, 112-123.
- ✓ Kruijff, S. E., Bastiaannet, AC., Kobold, RJ van ginkel., AJ Suurmeijer, e HJ Hoekstra. (2009). *"S-100B concentrations predict disease-free survival in stage III melanoma patients."*. 12, 3455–3462.
- ✓ Kusewitt, D.F. & Rush, L.J. (2007). *Neoplasia and tumor biology* In McGavin, M. D. & Zachary, J. F., *Pathology Basis of Veterinary Disease*. (4ªed.). Mosby Elsevier. China. 253-294.
- ✓ Leclerc, E., CW Heizmann, e SW Vetter. (2009). *"RAGE and S100 protein transcription levels are highly variable in human melanoma tumors and cells."* Gen Physiol Biophys. 28, 65-75.
- ✓ LeCouteur, R.A., Fike, J.R., Cann, C.E. & Pedroia, V.G (1981). *Computed tomography of brain tumors in the caudal fossa of the dog*. Veterinary Radiology. 22, 244-251.
- ✓ Lee, JL., Mukhtar, H., Bickers, DR., Kopelovich, L, Athar M. (2003). *Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications*. Toxicology and Applied Pharmacology. 192, 294-306.

- ✓ Li, G., Sathyamoorthy, K., Herlyn, M. (2002). *Dynamics of cell interactions and communications during Melanoma Development*. Critical Review Oral Biology Medicine. 13, 1, 62-70.
- ✓ Liptak, J. M., e S. J. Withrow. (2007). "Cancer of Gastrointestinal Tract." In: *Small Animal Clinical Oncology*, por S.J Withrow, & D. M Vail,. St. Luis, saundes – elsevier Missouri. 455-475.
- ✓ Liptak, J. M. & Withrow, S. J. (2013). *Oral Tumors*. In S. J., Withrow, D. M, Vail & R. L., Page, Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 5ªed. Elsevier/Saunders St. Louis, Missouri. 381-398.
- ✓ Looper, J.S., Malarkey, D.E., Malarkey, D. E., Ruslander, D., Proulx, D., Thrall, D. E. (2006). "Epidermal growth factor receptor expression in feline oral squamous cell carcinomas." *Vet Comp Oncology* 4(1), 33-40.
- ✓ London, C., Mathie, T., Stingle, N., Clifford, C., Haney, S., Klein, M. K., Beaver, L., Vickery, K., Vail, D. M., Hershey, B., Ettinger, S., Vaughan, A., Alvarez, F., Hillman, L., Kiselow, M., Thamm, D., Higginbotham, M. L., Gauthier, M., Krick, E., Phillips, B., LaDue, T., Jones, P., Bryan, J., Gill, V., Novasad, A., Fulton, L., Carreras, J., McNeil, C., Henry, C. & Gillings (2012). *S. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia®) in solid tumors*. *Veterinary and Comparative Oncology*. 10, 194-205.
- ✓ Liptak, J. M., Withrow, S. J. (2007) "Cancer of the gastrointestinal tract. Section A: Oral Tumours." In: S. J. Withrow and D. M. Vail (Eds.). *Small Animal Clinical Oncology*. Saunders Elsevier, Canada. 455-475.
- ✓ March, P.A. (2000). *Diseases of the brain*. In S.J. Birchard and R.G. Sherding (Eds.), *Saunders Manual of Small Animal Practice*. W.B, 2ªed, Saunders Co. Philadelphia. 1249-1269.
- ✓ MacEwen, E. G. (1990) "Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment." 9(2), 125-136.
- ✓ MacEwen, EG., Kurzman, ID., Vail, DM., Dubielzig, RR., Everlith, K., Madewel, I BR., Rodriguez, CO., Phillips, B., Zwahlen, H., Obradovich, J., Rosenthal, R.C., Fox, L.E., Roseberg, M., Henry, C., Fidel, J. (1999). *Adjuvant therapy for melanoma in dogs: results of randomized clinical trials using surgery, liposome-encapsulated muramyl tripeptide, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor*. *Clinical Cancer Research*. 5, 4249-58.
- ✓ Maroco, J. (2014). *Análise Estatística: Com o SPSS Statistics* (6ª ed.). Lisboa: ReportNumber. ISBN 978-989-96763-4-3.
- ✓ Mckee, PH. (2005). *Malignant melanoma*. In: *Pathology of the skin with clinical correlation*. 2ªed. Mosby-Wolfe, Londres. 1309-1356.
- ✓ Mendoza, M. & Khanna, C. (2009). *Revisiting the seed and soil in cancer metastasis*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 41, 1452-1462.

- ✓ Millanta, F.; Fratini, F. Corozza, M; Castognoro, M, Zappulli, V. Poli, (2002). *A Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behavior.* Research in Veterinary Science. 73, 45–51.
- ✓ Mihim, M.C.,JR,M.D.,Wallace,H.,Clark,M.D.,Lynn-From, M.D (1971). *The clinical diagnosis, Classification and Histogenetic concepts of the early stages cutaneous malignant melanomas.* The New England Journal of Medicine.
- ✓ Modiano, J. F., Ritt M.G., Wojcieszyn, J. (1999). “*The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy.*” J Vet Intern Med. 13(3), 163-74.
- ✓ Moretti, S., Spallanzani, A., Chiarugi, A., Fabiani, M., Pinzi, C. (2001). *Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness.* J Am Acad Dermatology. 44, 188.
- ✓ Morris, J. & Dobson, J. (2001). Head and Neck. In J. Morris & J. Dobson, *Small Animal Oncology.* (1ed.) Oxford: Blackwell Science Ltd., 104-115.
- ✓ Morris, J., Dobson, J. (2002). Cabeza e cuello. In: Morris J, Dobson J, eds. *Oncología en Pequeños Animales.* Inter-Médica Editorial, Buenos Aires, Argentina. 92-101.
- ✓ Mosqueda, Taylor A. (2008). *New findings and controversies in odontogenic tumors.* Med Oral Pathology Oral surgery Bucal.
- ✓ Mould, J .R.B., Petersen-Jones, S.M., Peruccio, C., Ratto, A., Sassani, J. W., Harbour, J.W. (2002). *Uveal melanocytic tumors.* In: Peiffer JR, R.L.; Jr, Simons, K.B (Ed). *Ocular tumors in animals and humans .*Ames: Iowa Stat press, Ames. 225-282.
- ✓ Moura, S.A.,Catão,M.H., Gerbi, M., Beltao, R.V. (2006). *Biologic Markers in Oral Cancer.* International Journal of Dentistry. 1 (2), 59-62.
- ✓ Muller, R. M., Scott, D, W., Griffin, C., Muller and Kirk´s.(2001).*Small animal dermatology.*6ªed: W.B Saunders. Philadelphia, 1528.
- ✓ Munday, J. S., Löhr, C. V. & Kiupel, M. (2016). *Tumors of the alimentary tract.* In D. J., Meuten, *Tumors in domestic animals.* (5ª Ed.). John Wiley & Sons,Ames, Iowa. 499-602
- ✓ Murphy, S., Hayes, A. M., Blackwood, L., Maglennon, G., Pattinson, H., Sparkes, A. H. (2005) “*Oral malignant melanoma - the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy.*” 3(4), 222-229.
- ✓ Neal, C.P. & Berry, D.P. (2006). *Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis,* Surgery. 24 (4), 120-125
- ✓ Nelson, R.W., Couto, C.G. (1992). *Disorders of the oral cavity, pharynx, and esophagus.* In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small Animal Internal Medicine,* 3rd ed. St. Louis, EUA. 992:405-417.
- ✓ Nishiya, A. T., Massoco, C. O., Felizzola, C. R., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M. V.,Garcia, J. S., Mendonça, P. P., Teixeira, T. F. & Dagli, M. L. (2016). *Comparative Aspects of Canine Melanoma.* *Veterinary Science.* 3, (7) 1-22.
- ✓ North, S., & Banks, T. (2009). *Introduction to small animal oncology.*Saunders Elsevier, China. 1-3.

- ✓ O'Brien, D.P., & Axlund, T.W., Brain Disease. In In S.J. Ettinger & E.C. Feldman (2005) (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ed, Elsevier Saunders, Philadelphia. 803-835.
- ✓ Ohsie, S.J., Sarantopoulos, GP., Cochran, AJ., Binder, SW. (2008). *Immunohistochemical characteristics of melanoma*. J Cutan Pathol., 35(5), 433-44.
- ✓ Orchard, GE. (2000). Comparison of immunohistochemical labeling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J.*, 32, 475.
- ✓ Owen, L. N. (1980). "*TNM classification of tumours in domestic animals*." World Health Organization. Geneva,

- ✓ Parente, L., Perretti M. (2003). *Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight*. *Biochemical Pharmacology*. 65, 153-59.
- ✓ Peña, L. L., Nieto, A. I., Perez-Alenza, D., Cuesta, P., Castano, M (1998). "*Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables*." 10(3), 237-246.

- ✓ Pernick, NL., DaSilva, M., Gangi, M.D., Crissman, J., Adsay, V (1999). "*Histiocytic markers*" in melanoma. *Mod Pathology*. 12 (11), 1072-7.

- ✓ Perrone, E.A. (2001). *Análise histológica e imunohistoquímica da proliferação celular de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas: estudo retrospectivo*. Tese Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

- ✓ Pietzsch J. (2011). *S100 proteins in health and disease*. *Amino Acids*. 41 (4), 755-60.

- ✓ Pires, I., Garcia, A., Prada, J., & Queiroga, F. L. (2010). COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. *Journal of Comparative Pathology*, 143(2-3), 142-149

- ✓ Popowski, P. (1997). Editora limitada. São Paulo.

- ✓ Prado, AMB., Rodigher, i SM., Júnior, JAV., Werner, J., Tasqueti, U., Bacchi, R. (2008). *Tumor odontogênico epitelial calcificante em um cão - relato de caso*. *Clínica Veterinária*. 72, 46-50.

- ✓ Prasad, M.L., Jungbluth, A.A., Iversen, K., Huvos, A.G., Busam, KJ. (2001). *Expression of melanocytic differentiation markers in malignant melanomas of the oral and sinonasal mucosa*. *Am J Surgery Pathology*. 25, 782-7.

- ✓ Polsky, D., Melzer, K., Hazan, C. et al. (2001). *HDM2 protein overexpression and prognosis in primary malignant melanoma*. *J Natl Cancer Institute*. 94, 1803-6.

- ✓ Pollard, R.E., Reilley, C.M., Uerling, M.R., Wood, F.D. & Feldman, E.C. (2010). *Cross-sectional imaging characteristics of pituitary adenomas, invasive adenomas and adenocarcinomas in dogs: 33 cases (1988-2006)*. Journal of Veterinary Internal Medicine. 24, 160-165.
- ✓ Proulx, D. R. et al (2003). "A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation." Veterinary Radiology & Ultrasound. 44, (3)352-359.
- ✓ Queiroz, G, F., Matera, J.M. (2004). *Utilização da crioterapia no tratamento de sarcomas de tecidos moles em cães*. Simpósio de oncologia Veterinária da universidade de São Paulo.
- ✓ Queiroz, S.L., Batista, A.A. (1998). *Funções biológicas do óxido nítrico*. Química Nova. São Paulo. [Http://w.../scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000400017&1ng=pt&nrm=is](http://w.../scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000400017&1ng=pt&nrm=is).
- ✓ Ramos-Vara, J. A., Beissenherz, M. E., Miller, M. A., Johnson, G. C., Pace, L. W., Fard, A., Kottler, S. J. (2000). "Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases." 37(6), 597-608.
- ✓ Requicha, J. F. M. F. (2010). *Neoplasias da cavidade oral do cão - Estudo retrospectivo de 14 anos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Vila Real: Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias - Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
- ✓ Rodríguez-Queirós, J., Trobo, Muñoz J., San Román, F. (1998). *Neoplasias orales en pequeños animales*. Cirugía maxilofacial I. In: Ascaso FSR, ed. Atlas de Odontologia en Pequeños Animales. Grass Edicions, Madrid, Espanha. 143-161.
- ✓ Ruiz, F.S., Alessi, A.C., Chagas, C.A., Pinto, G.A., Vassallo, J. (2005). "Immunohistochemistry in veterinary pathology: a critical review". J Bras Patol Med Lab. 41(4), 263-270.
- ✓ Scase, T. J., Edwards, D., Miller, J., Henley, W., Smith, K., Blunden, A., Murphy, S. (2006). "Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis." J Vet Intern Med. 20 (1), 151-158.
- ✓ Scholzen, T., Gerdes J. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiology. 182(3), 311-322.
- ✓ Silva, M.S.B., Menezes, L.B., Sales, T.P., Lima, F.G., Paulo, N.M. (2006) *Tratamento de melanoma oral em um cão com criocirurgia*. Acta Scientiae Veterinariae. 34, 211-213.
- ✓ Simmons, DL. (2003). *Variants of Cyclooxygenase-1 and their roles in medicine*. Thrombosis Research. 110, 265-68.
- ✓ Smedley, R.C., Spangler, W.L., Esplin, D.G., Kitchell, B.E., Bergman, P.J., Ho, H.Y., Bergin, I., Kiupel (2011a). M. *Prognostic markers for canine melanocytic neoplasia: a comparative review of the literature and goals for future investigation*. Veterinary Pathology. 48, 1.
- ✓ Smedley, R. C., Lamoureux, J., Sledge, D.G., Kiupel, M. (2011b). *Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms*. Veterinary Pathology. 48, 54-72.

- ✓ Smedley, R. (2012). Review of the Prognostic Evaluation of Canine Melanomas. *Veterinary Clinical Pathology*, 5–10.
- ✓ Smith, S. H., Goldschmidt, M. H., Mcmanus, P.M. (2002). *A comparative review of Melanocytic Neoplasms*. *Veterinary Pathology*. 39, 651-678.
- ✓ Spangler, WL & Kass PH. (2006). *The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia*. *Veterinary Pathology*. 43,136-49.
- ✓ Stafford, L.J., Vaidya, K.S., & Welch, D.R. (2008). Metastasis suppressor's genes in cancer, *The International Journal of Biochemistry*. 40, 874-891.
- ✓ Sulaimon, S. S., Kitchel B. E. (2003) "*The Basic Biology of Malignant Melanoma: Molecular Mechanisms of Disease Progression and Comparative Aspects*." *J Vet Int. Med.* 17(6), 760 – 772.
- ✓ Sulaimon, S.S., Kitchel, B. E., Ehrhart, E.J. (2002). *Immunochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma*. *Journal Comparative Pathology*. 127,162-168.
- ✓ Switzer, CH, et al. (2012). *Ets-1 is a transcriptional mediator of oncogenic nitric oxide signaling in estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Res*.14 (5).
- ✓ Sweet, M.,Kirkham, N.,Bendall, M.,Gurrey, L.,Bythell J. et al. (2012). *Evidence of melanoma in wild marine fish populations, 1989*.
- ✓ Talve, K., Kainu, J., Collan, Y., Ekfors T. (1996). *Immunohistochemical expression of p53 protein, mitotic index and nuclear morphometry in primary malignant melanoma of the skin*.192, 825.
- ✓ Tanaka, N., Odajima, T, Mimura, M., Ogi, K., Dehari, H., Kimijima, Y., Kohama, G. (2001). *Expression of Rb, pRb2/p130, p53, and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa*. *Oral Oncology*. 37(3), 308-14.
- ✓ Teixeira, T, F., Silva, T.C., Cogliati, B., Nagamine, M.K., Dagli, M.L.Z. (2010). *Retrospective study of melanocytic in dogs and cats*. *Brazilian Jornal Veterinary Pathology*. 3, (2), 100-104.
- ✓ Theon, A. P., Rodriguez, C., Madewell, B. R (1997). "*Analysis of prognostic factors and patterns of failure in dogs with malignant oral tumors treated with megavoltage irradiation*." 210(6), 778-84.
- ✓ Thody, A.J., Shuster,S. (1989). *Melanophores melanocytes and melanin; endocrinology and farmacology*. In: Greaves, M.W., Shuster, S. *Pharmacology of Skin*, Berlim: Springer-Verlag. 1, 257-269.
- ✓ Trandler, N. B., Mosch, e J. Pietzch. (2012) "*Protein and non-prtein biomarkers in melanoma: a critical update*." *Amino Acids* 43, 2203-2230.

- ✓ Treggiari, E., Grant, J.P. & North, S.M. (2016). *A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma*. The Journal of Veterinary Medical Science. 78 (5), 845-850.
- ✓ Tuohy, J.L., Selmic, L.E., Worley, D.R., Ehrhart, N.P. & Withrow, S.J. (2014). *Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998-2011)*. Journal of the American Veterinary Medical Association. 254,1266-1273.
- ✓ Vail, D. M., E. G. MacEwen (2000). "Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer." Cancer Invest 18(8): 781–792.
- ✓ Vail, D. M., Withrow, S. J. (2007). *Tumors of the skin and subcutaneous tissues*. In: Withrow, S. J., Macewen's, E. G. Small Animal Clinical Oncology. Ed. Missouri: Saunders Elsevier. 18, 389- 393.
- ✓ Vallance, P. and Collier (1999). *Endothelial nitric oxide in human in health and disease*. 80(6), 291-303.
- ✓ Van Diest, P.J.V., Brugal, G., Baak, J. P. (1998). "*Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value*." 51(10), 716-724.
- ✓ Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., & Mutinelli, F. (2009). *Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumors in dogs and cats*. BMC Veterinary Research.5, 39.
- ✓ Vereecken, P. F., Cornelis, N.V., Baren, V., Vandersleyen, e J-F Baurain. (2012) "Review Article. *A Synopsis of Serum Biomarkers in Cutaneous Melanoma Patients*." Dermatology Research and Practice.
- ✓ Verhaert, L. (2001). *Oral proliferative lesions in dogs and cats*. In: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Congress. Vancouver, Canadá.
- ✓ Verstraete, FJ. (1995). *Advanced oral surgery in small carnivores*. In: Crossley DA, Penman S, eds. BSAVA Manual of Small Animal Dentistry. Gloucester, Inglaterra BSAVA. 193-207.
- ✓ Verstraete, FJ. (2003). *Odontogenic tumors*. In: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Congress. Bangucoque, Tailândia.
- ✓ Verstraete, F.J.M. (2005). *Mandibulectomy and Maxillectomy*. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 35, (4) 1009-1039.
- ✓ Verstraete, F.J.M., Ligthelm, A.J., Weber, A. (1992). *The histological nature of epúlides in dogs*. Journal of Comparative Pathology. 106, 169-182.
- ✓ Vihinen, PP., Pyrhonen SO, Kahari VM. (2003). *New prognostic factors and developing therapy of cutaneous melanoma*. 35, 66-78.

- ✓ Vogt, T., Zipperer, K.H., Vogt, A., Holzel, D., Landthaler, M., Stolz, W. (1997). *P53-protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin*. *Histopathology*. 30: 57.
- ✓ Wang, H.H. et al. (2000). *B16 melanoma cell arrest in the mouse liver induces nitric oxide release and sinusoidal cytotoxicity: a natural hepatic defense against metastasis*. *Cancer Research*. 60:15, 5862-5869.
- ✓ Wakamatsu, A., Simões, A.B., Kanamura, C.T. et al. (1995). *Manual de Imuno-Histoquímica com menções à técnica de hibridização molecular*. Sociedade Brasileira de Patologia. 99.
- ✓ Wallace, J., D.T. Matthiesen, e A.K Patnaik. (1992). "Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs." *Veterinary Surgery* 21, (5) 337-341.
- ✓ Warner, TD & Mitchell JA. (2004). *Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic*. *FASEB J*. 18,790-804.
- ✓ Williams, CS., Mann, M., DuBois, RN. (1999). *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*. *Oncogene*.18, 7908-16.
- ✓ Williams, L. E. & Packer, R. A (2003). *Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001)*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 222, 1234-1236.
- ✓ Wink, D.A. et al. (1998). *The multifaceted roles of nitric oxide in cancer*. *Carcinogenesis*.19, (5) 711-721.
- ✓ Withrow, S.J. (2001). *Cancer of the oral cavity*. In: Withrow, S.J. *Cancer of gastrointestinal tract*. *Small animal clinical oncology*. 3 ed. Philadelphia, Saunders. 305-318.
- ✓ Withrow, SJ & Vail DM. (2007). *Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues*. In: *Withrow & McEwen's small animal clinical oncology*. 4ªed. Elsevier Health Sciences. 389-93.
- ✓ Withrow, S., Vail, D., & Page, R. (2012). *Small Animal Oncology*. (D. Vail, Ed.) (5a Edição). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- ✓ White, R. A. S. (2003a). "Mast cell tumors." In: *BSAVA: manual of canine and feline oncology*, por J. M. Dobson, & B. D. X. Lascelles. Gloucester: BSAVA., 161-167
- ✓ White, R.A.S. (2003b). *Tumors of the oropharynx*. In: Dobson JM, Lascelles BD, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Oncology*. Gloucester, Inglaterra: BSAVA. 206-213.
- ✓ World Health Organization Cancer. (2016).

- ✓ Wright JM, Vered M. Update from the 4th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumors. *Head Neck Pathol* 2017; 11(1):68-77.
- ✓ Wu, X. Z., Wang, Y., XU, R., Ren, B., Heng, Z. Su. (2014). *Association between three iNOS polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 15 (13), 5317-5324.
- ✓ Xie, R. M.P., Schlumbrecht, T. G.L., Shipley, S., Xie, R.L., Jr Bassett., RR, Broaddus. (2009) "*S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling.*" *Lab Invest* 89. 8, 937–947.
- ✓ Yu, Chuan-Hang., Huang-Hsu, Chen., Chia-Ming Liu., Yung-Ming., Jeng, Jeng-Tzung Wang, Yi-Ping Wang, Bu-Yuan Liu, Andy Sun, Chun-Pin Chiang. (2005) HMB-45 may be a more sensitive maker than S-100 or Melan-A for immunohistochemically diagnosis of primary oral and nasal mucosal melanomas. *Journal of oral pathology e medicine*. 34(9), 540-5.
- ✓ Yao, L. F., Fang, Y., Zhong, L. Yu. (2010). *The association between two polymorphisms of iNOS and breast cancer risk: a meta-analysis*. *Breast Cancer Research and Treatment*. Springer US. 124, 223-227.
- ✓ Zafra, R., Jaber, JR., Perez-Ecija, RA. *et al.* (2008). *High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniosis is associated with low intracellular parasite burden*. *Vet Immunologic Immunopathology*. 123,353–359.