MARIA LUÍSA DE LIMA LANDMAN

**Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias
melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos**

São Paulo

2011

MARIA LUÍSA DE LIMA LANDMAN

**Expressão de marcadores imunoistoquímicos em
neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo
de tecidos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia Experimental e Comparada

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

2435
FMVZ

Landman, Maria Luísa de Lima
Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias
melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos / Maria Luísa de Lima
Landman. -- 2011.
101 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo,
2011.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Maiorka.

1. Neoplasias melanocíticas. 2. Equinos. 3. Imunoistoquímica.
4. Microarranjo de tecidos. 5. Pigmentação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Neoplasias melanocíticas de eqüinos: análise de s-100, Melan-a, HMB-45, ki-67, PCNA e p53", utilizando 30 (trinta) cavalos, protocolado sob o nº1723/2009, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/08/09.

We certify that the Research "Melanocytic neoplasma of equine: analysis of s-100, Melan-A, HMB-45, ki-67, PCNA e p53", utilizing 30 (thirty) horses, protocol number 1723/2009, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/19/09.

São Paulo, 24 de agosto de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética da FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 187
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
(050) 4.270

Fax: 55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: LANDMAN, Maria Luísa de Lima

Título: Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha família, que esteve junto a mim nesta etapa, principalmente ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr Paulo César Maiorka, por ter me aceito como aluna e acreditado no projeto de mestrado, me auxiliando e possibilitando a realização desta dissertação.

Aos meus pais, pela paciência, amor e dedicação recebidos durante toda a minha vida, sem eles nada seria possível.

À Cristina de Oliveira Massoco Salles-Gomes, por ter aberto os caminhos para o início deste trabalho e me aconselhado no decorrer deste período.

Ao corpo docente da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela excelência na elaboração dos cursos e ensino dos alunos.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo incentivo, auxílio e compreensão durante este período.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo por ter possibilitado a realização do estágio em imunoistoquímica.

Aos funcionários, Ivan Neves, Simone Pagodi e Maria de Fátima, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pelos ensinamentos técnicos e amizade.

Aos funcionários, Cláudio Arroio e Luciano Antas Bugalho, do Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela paciência e amizade durante este período, além do auxílio na confecção das lâminas.

Ao Dr. Roberto Falzoni, por ter disponibilizado seu laboratório (APC) e conhecimento de forma tão generosa, quando parava seus afazeres para me auxiliar.

Aos amigos do laboratório APC pela diversão, incentivo e auxílio técnico em todas as dúvidas que tive.

Ao Sr. Carlos Eugênio Nascimento Braga, funcionário do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de São Paulo, pelo auxílio na confecção do *tissue microarray*.

A todas as funcionárias da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, pela prestatividade e auxílio nos levantamentos e revisão bibliográfica.

À Elza Faquim, Bibliotecária, pela formatação deste trabalho e pelo constante incentivo.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (projeto 08/55940-0) e Projeto Jovem Pesquisador (05/60606-3).

RESUMO

LANDMAN, M. L. L. **Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos.** [Expression of immunohistochemical biomarkers in equine melanocytic neoplasms using tissue microarray]. 2011. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento morfológico e a expressão das proteínas S-100, Melan-A, HMB-45, Ki-67, PCNA e p53, em 25 neoplasias melanocíticas de equinos. Informações clínicas (gênero, raça, pelagem, idade e localização da lesão) e morfológicas (características celulares, pigmentares, nucleares, de nucléolo, de melanófagos, presença de invasão e necrose) dos animais foram coletadas. Para a expressão das proteínas por imunoistoquímica foi confeccionado um bloco de microarranjo de tecidos das amostras teciduais, juntamente com os controles positivos das reações. A avaliação da expressão das proteínas S100, HMB-45 e Melan-A foi baseada em um escore, e a das proteínas Ki-67, PCNA e p53 foi feita por contagem de células. Animais SRD (16/25, 64%), de raça Lusitana (6/25, 24%), Árabe (2/25, 8%) e Sueca (1/25, 4%) fizeram parte deste estudo, todos tordilhos e a maioria machos (18/25, 72%). A idade dos animais variou de 4 a 24 anos (média de 13 anos). A região perianal (13/25, 52%) foi a que mais apresentou neoplasias. Na análise morfológica houve predomínio de neoplasias com celularidade moderada (52%) e intensa (40%), distribuição difusa e em feixes (52%), ausência de figuras de mitose (96,0%) e predomínio de células epitelióides e fusiformes no mesmo tumor (80%). A atipia nuclear era discreta (48%) e moderada (44%), com núcleos de formato arredondado e alongado em um mesmo tumor (76%) e cromatina dispersa (60%). Os nucléolos eram múltiplos e, em sua maioria, proeminentes (88%). Observou-se predomínio de células tumorais de pigmentação intensa (68%), distribuição difusa e localização em derme (100%). A maioria dos casos apresentou alta celularidade de macrófagos (64%) e distribuição difusa (96%). Quanto à expressão de proteínas para melanócitos por imunoistoquímica, 44% dos casos apresentaram expressão moderada a forte de S100, 56% apresentaram expressão fraca de HMB-45 e 64% apresentaram expressão negativa de Melan-A. Houve positividade de 72% dos casos para pelo menos dois dos anticorpos citados acima. Os anticorpos de proliferação celular Ki-67 e PCNA tiveram média de

acima. Os anticorpos de proliferação celular Ki-67 e PCNA tiveram média de positividade de 0,0005% e 15,7%, respectivamente. A análise da expressão de p53 teve média de 6,1% de positividade. Houve associação estatisticamente positiva entre a celularidade dos macrófagos com S100 e com p53. Em conclusão: 1. os dados clínicos obtidos reproduzem o comportamento biológico das neoplasias melanocíticas em equinos, exceto pela idade dos animais; 2. as neoplasias equinas se assemelham a nevos azuis celulares em humanos e melanocitomas em cães; 3. o microarranjo de tecidos mostrou-se uma maneira econômica, rápida e com menos variáveis técnicas; 4. a utilização de um painel de anticorpos de melanócitos é pertinente na diferenciação entre tumores melanocíticos e não melanocíticos, reproduzindo o painel diagnóstico utilizado em literatura humana e canina; 5. o índice de proliferação celular encontrado sugere que os dois anticorpos (Ki-67 e PCNA) podem ser usados na contagem de células em atividade mitótica e 6. a proteína p53 tem maior relação com a parada do ciclo celular que a observada em outros estudos em equinos, podendo indicar um comportamento biológico diferente do apresentado em cães e humanos.

Palavras-chave: Neoplasias Melanocíticas. Equinos. Imunoistoquímica. Microarranjo de Tecidos. Pigmentação.

ABSTRACT

LANDMAN, M. L. L. **Expression of immunohistochemical biomarkers in equine melanocytic neoplasms using tissue microarray** [Expressão de marcadores imunoistoquímicos em neoplasias melanocíticas de equinos por microarranjo de tecidos]. 2011. 101p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The aim of this study was to evaluate the morphological behavior, and expression of the following proteins: S-100, Melan-A, HMB-45, Ki-67, PCNA and p53, in 25 equine melanocytic neoplasms. Clinical (gender, breed, coat color, age and lesions location) and morphological (cellular, pigment, nuclear, nucleoli, melanophages, invasion and necrosis) data were collected. A tissue microarray block, embedded in paraffin, with equine tissue samples and positive controls, was elaborated for protein expression through immunohistochemistry. The evaluation of S100, HMB-45 and Melan-A was based on a score, and for Ki-67, PCNA and p53 it was based on cellular count. Breeds were: Mixed breed (16/25, 64%), Lusitano (6/25, 24%), Arab (2/25, 8%) and Swedich (1/25, 4%). All animals were gray and the majority males (18/25, 72%). Age varied from 4 to 24 years old (mean=13 years). The perianal region (13/25, 52%) was the most common location. Morphological analysis have shown neoplasms with predominantly moderate (52%) and intense (40%) cellularity, diffuse and fascicles distribution (52%), no mitoses figures (96%) and predominance of epithelioid and spindle cells in the same tumor (80%). There was discrete (48%) and moderate (44%) nuclear atypia, round and elongated nucleus in the same tumor (76%), and disperse chromatin (60%). Nucleoli were multiple and prominent in the majority of cases (88%). Tumor cells with diffuse and intense pigmentation, with dermal location (100%) were predominant. High cellularity of macrophages (64%) with diffuse distribution (96%) was mostly seen. The protein expression for melanocytes have shown 44% of moderate to strong expression for S100 protein, 56% of weak expression for HMB-45 protein and 64% of negative expression for Melan-A protein. It was found positivity for more than two antibodies in 72% of equine melanocytic neoplasms. The proliferation antibodies Ki-67 and PCNA had mean positivity of 0,0005% and 15,7%, respectively. The p53 expression had mean positivity of 6,1%. Macrophages cellularity was statistically associated with S100 and p53. In conclusion: 1. clinical data obtain reproduce the biological behavior of equine

Macrophages cellularity was statistically associated with S100 and p53. In conclusion: 1. clinical data obtain reproduce the biological behavior of equine melanocytic neoplasms, excepting the animals age; 2. equine melanocytic neoplasms assemble to human cellular blue nevi and dogs melanocytoma; 3. the tissue microarray was shown to be an economic, rapid and less variable technique; 4. using a panel for antibodies for melanocytes is relevant to differentiate melanocytic and not melanocytic tumors, reproducing the diagnosis panel used in human and canine literature; 5. the proliferation index found suggests that both antibodies (Ki-67 and PCNA) could be used in mitotic activity cell count; and 6. p53 protein has more relation with cellular cycle stop than in other equine studies, probably indicating a different biological behavior than the presented in humans and dogs.

Keywords: Melanocytic neoplasms. Equine. Immunohistochemistry. Tissue Microarray. Pigmentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia do bloco e lâmina do TMA de neoplasias melanocíticas equinas	46
Figura 2 – Fotografia em microscópio óptico (10x) de lâmina corada por HE representando uma amostra de cilindro de um milímetro de diâmetro do TMA	46
Figura 3 – Planilha de identificação e localização dos 25 casos analisados no bloco de TMA, juntamente com os controles positivos para os anticorpos	47
Figura 4 - Expressão negativa de S100.....	57
Figura 5 – Expressão fraca de S100	57
Figura 6 – Expressão moderada/forte de S100	58
Figura 7 – Expressão negativa de HMB-45	59
Figura 8 – Expressão fraca de HMB-45.....	59
Figura 9 – Expressão moderada/forte de HMB-45	60
Figura 10 – Expressão negativa de Melan-A	61
Figura 11 - Expressão fraca de Melan-A	61
Figura 12 – Expressão moderada/forte de Melan-A	62
Figura 13 – Expressão negativa de Ki-67	63
Figura 14 – Expressão positiva para Ki-67	63
Figura 15 – Expressão negativa de PCNA	64
Figura 16 – Expressão positiva para PCNA.....	65
Figura 17 – Expressão negativa de p53	66
Figura 18 – Expressão positiva de p53.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metodologia de determinação dos escores para análise de marcação citoplasmática dos anticorpos anti-S100, HMB-45 e Melan-A.	50
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos anticorpos utilizados no estudo de neoplasias melanocíticas de equinos.	48
Tabela 2 – Distribuição dos 25 casos analisados de acordo com gênero, raça, idade e localização da lesão melanocítica.....	53
Tabela 3 – Distribuição dos 25 casos analisados de acordo com as características morfológicas tumorais.....	55
Tabela 4 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a mediana do escore de marcação dos anticorpos para melanócitos com as características morfológicas tumorais.....	68
Tabela 5 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a média e desvio padrão da marcação dos anticorpos de proliferação celular com as características morfológicas tumorais. Colocar significância	69
Tabela 6 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a média e desvio padrão da marcação por p53 com as características morfológicas tumorais.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD44	<i>Cyclin 44</i>
cDNA	DNA complementar (do inglês <i>complementary DNA</i>)
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxiribonucleic Acid</i>)
FISH	do inglês <i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GADD45	do inglês <i>Growth Arrest and DNA Damage</i>
gp100	glicoproteína 100
HMB-45	<i>Human Melanoma Black 45</i>
HMB-50	<i>Human Melanoma Black 50</i>
kD	<i>kilo Daltons</i>
MART-1	do inglês <i>Melanoma Antigen Recognized by T-cells</i>
Mdm2	do inglês <i>Mouse Double Minute 2</i>
Mdm4	do inglês <i>Mouse Double Minute 4</i>
Mel-5	<i>Melanoma 5</i>
Melan-A	do inglês <i>Melanocyte Antigen</i>
Mel-CAM	do inglês <i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
MITF	do inglês <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
NKI-beteb	<i>Melanoma Associated Antigen 100+ / 7 kDa antibody</i>
NKI/C3	<i>Melanoma Associated Antigen 100+ / 7 kDa antibody</i>
p14arf	protein p14arf
p16ink4a	proteína 16ink4a
p19arf	proteína 19arf
p21	proteína 21
p53	proteína 53
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (do inglês <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>)
PMel17	<i>Premelanosome protein 17</i>
PUMA	do inglês <i>p53 up regulated modulator of apoptosis antibody</i>
Rb	Retinoblastoma
RNA ISH	do inglês <i>RNA in situ hybridization</i>
S100	Solúvel 100% em sulfato de amônio
SRD	Sem Raça Definida
TMA	Microarranjo de Tecidos (do inglês <i>Tissue Microarray</i>)
TP53	do inglês <i>Tumor Protein 53</i>
TRP-1	do inglês <i>Tyrosinase related protein 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 ESTUDO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EM EQUINOS	23
2.2 GÊNESE DO MELANOMA.....	28
2.3 MARCADORES TUMORAIS USADOS NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS	32
2.3.1 Anticorpos para melanócitos.....	33
2.3.2 Anticorpos de proliferação celular.....	35
2.3.3 A proteína p53	36
2.4 O MICROARRANJO DE TECIDOS (TISSUE MICROARRAY - TMA).....	38
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 INFORMAÇÕES DOS ANIMAIS EM ESTUDO	43
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	43
4.3 MÉTODO.....	43
4.3.1 Análise Morfológica.....	44
4.3.2 Classificação das lesões melanocíticas.....	45
4.3.3 Construção e análise do microarranjo de tecidos	45
4.3.4 Estudo Imunoistoquímico.....	48
4.3.5 Leitura das lâminas.....	50
4.3.6 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS	53
5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	53
5.2 DESCRIÇÃO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA	54
5.3 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES MELANOCÍTICAS	56
5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POR IMUNOISTOQUÍMICA	56
5.5 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS	67
6. DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	85
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias melanocíticas são caracterizadas pela proliferação contínua, benigna ou maligna, de células produtoras de melanina (melanócitos). Diversos estudos realizados em humanos e cães caracterizam clínica e morfolologicamente esta doença, além de estudos de expressão de proteínas por imunoistoquímica. Em equinos, poucos são os estudos que as caracterizam e, há apenas dois realizados com imunoistoquímica, sendo ambos contraditórios. As neoplasias cutâneas em equinos representam 50% de todas as neoplasias encontradas nesta espécie e, até 15% destas são melanocíticas. Os animais de pelagem tordilha são os mais acometidos, e começam a apresentar lesões a partir dos cinco anos de idade, época em que ocorre a despigmentação dos pelos.

A classificação de lesões melanocíticas mais utilizada em equinos relaciona a análise morfológica das lesões e o número de nódulos apresentados por animal (VALENTINE., 1995), porém, apresenta restrições, uma vez que os padrões morfológicos se confundem. Tendo em vista tal fato, estudos morfológicos mais detalhados são necessários, para que forneçam informações importantes a respeito das neoplasias para posterior classificação mais rigorosa de acordo com padrões morfológicos previamente relatados.

Sabe-se que em humanos e cães a técnica de imunoistoquímica é útil na diferenciação de neoplasias melanocíticas e não melanocíticas, na identificação do grau de malignidade tumoral e classificação das neoplasias de acordo com a marcação imunoistoquímica para anticorpos específicos. A utilização desta técnica como ferramenta de auxílio ao diagnóstico, tratamento e prognóstico em neoplasias melanocíticas de equinos ainda não é difundida, devido aos poucos estudos realizados na área. Estudos em equinos possibilitariam desvendar mecanismos de desenvolvimento tumoral (como é o caso da utilização da proteína p53 para observar suas mutações em ciclo celular), progressão tumoral (com o estudo das proteínas Ki-67 e PCNA, que identificam células em divisão) e identificação de melanócitos para a diferenciação de neoplasias melanocíticas e não melanocíticas, (HMB-45, S100 e Melan-A).

Recentemente, o emprego da técnica de microarranjo de tecidos para a realização de estudos em grande escala tem se mostrado importante tanto na

padronização de técnicas como na rapidez e economia de material a ser utilizado. Sua utilização neste trabalho, para a realização da imunoistoquímica, teve como intuito: a análise simultânea de grande número de espécimes em uma mesma lâmina; uniformização da técnica, pois as amostras teciduais são tratadas de maneira idêntica, tornando a padronização igual para todos tecidos; o menor número de reações, economia de tempo e custos, devido às técnicas serem feitas em apenas uma lâmina, com menor necessidade de mão de obra e menor gasto com reagentes; a não destruição do bloco original, pela retirada de pequenos fragmentos, sem comprometer a integridade do bloco, utilização no controle interno e positivo de reações. A avaliação simultânea possibilita que haja também menos erros de interpretação, principalmente em se tratando de nuances de marcação celular.

Em conclusão este estudo é de extrema importância para complementar conhecimentos morfológicos e imunoistoquímicos das neoplasias melanocíticas encontradas em equinos. Além de lançar mão da técnica inovadora de microaarranjo de tecidos na veterinária, com grande potencial de ser utilizada em grande escala, em qualquer tipo de tecido, para a identificação de fenômenos nunca antes estudados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os temas abordados na revisão de literatura estão estruturados em tópicos a seguir:

2.1 ESTUDO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS EM EQUINOS

Equinos acometidos por neoplasias representam de um a três por cento do total da população examinada por clínicos veterinários (COTCHIN, 1977) e 18% dos casos examinados por patologistas (PASCOE; SUMMERS, 1981). Dentre as neoplasias mais comuns estão os sarcóides, carcinomas de células escamosas, tumores das células da granulosa, melanomas, papilomas, melanocitomas (nevus melanocíticos) e mastocitomas (COTCHIN, 1977; HARGIS, 1998).

As neoplasias cutâneas representam 50% das neoplasias encontradas em equinos (VALENTINE, 2006). Destas, 15% são de origem melanocítica (OHMURO et al., 1993; SMITH; GOLDSCHMIT; MCMANUS, 2002). Porém, seu diagnóstico histopatológico é feito em apenas 3,8% dos casos nesta espécie (SUNDBERG et al., 1977). Devido às características externas das lesões melanocíticas serem de fácil identificação, o diagnóstico clínico pode ser realizado a campo. Portanto, o encaminhamento de biópsias para confirmação histopatológica é reduzido, o que explica a diferença entre as porcentagens clínicas e histopatológicas de incidência da doença (FINTL; DIXON, 2001).

A apresentação inicial das neoplasias melanocíticas é em mais de 90% dos casos benigna e, aproximadamente dois terços delas progridem para a malignidade e são capazes de desenvolver metástases (SUNDBERG et al., 1977; VALENTINE, 1995; SMITH; GOLDSCHMIT; MCMANUS, 2002; VALENTINE, 2005). A progressão, em cavalos tordilhos idosos, frequentemente resulta em metástase (VALENTINE, 1995). As lesões metastáticas podem ocorrer em linfonodos, cavidades do organismo, fígado, rins, coração e trato gastrointestinal. O envolvimento da medula espinhal também foi descrito, com subsequente compressão medular e progressivas desordens neurológicas (ROELS et al., 2000).

Desde o início do século XX são descritos casos de neoplasia melanocítica em cavalos tordilhos (SELTENHAMMER et al., 2003) e geralmente se iniciam em animais entre cinco e dez anos de idade, época em que ocorre a troca de pelos escuros por mais claros (OHMURO et al., 1993; FLEURY et al., 2000b; SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Há relatos inferindo que a frequência de casos possa chegar a 80% em cavalos tordilhos, se estes atingirem mais de 15 anos de idade (VALENTINE, 1995; FLEURY et al., 2000b; ROELS et al., 2000; FINTL; DIXON, 2001; SELTENHAMMER et al., 2003; SELTENHAMMER et al., 2004) e, que todos os cavalos tordilhos terão neoplasia melanocítica se viverem tempo suficiente para seu desenvolvimento (FINTL; DIXON, 2001). Esta alta incidência está relacionada a eventos de despigmentação relacionados à idade dos animais (SELTENHAMMER et al., 2003) e à herança dominante do fenótipo de cor referente ao clareamento progressivo da cor do pelo (G) (FLEURY et al., 2000b; HENNER et al., 2002).

Em cavalos não tordilhos, como baios e castanhos, também pode haver neoplasias melanocíticas, porém, são mais susceptíveis a serem malignas (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Os locais de maior frequência de aparecimento destas neoplasias são a porção ventral da cauda, região perianal, lábios e pálpebras (FLEURY et al., 2000a). Em cavalos tordilhos, devido à despigmentação do pelo ao redor dos olhos e na região anal, há alta incidência nestas regiões (SELTENHAMMER et al., 2003).

Clinicamente, surgem como massas localmente invasivas, com pigmentos de coloração azul ou preta, formato de nódulos hemisféricos ou em cúpula, solitários ou múltiplos, firmes ou moles na derme, bem circunscritos e, raramente, ulcerados (VALENTINE, 1995; ROELS et al., 2000; SELTENHAMMER et al., 2003). As lesões precoces ocorrem inicialmente na derme intimamente associada ao apêndice epidérmico, diferente do observado em humanos, que têm lesões iniciais na junção dermo-epidérmica. Também acredita-se que as lesões melanocíticas em equinos crescem como processos auto-limitantes regulados por melanófagos que poderiam contribuir para sua regressão (FLEURY et al., 2000a).

Seu tamanho varia de 0,2 a 20 cm de diâmetro e podem se desenvolver sem nenhum sinal precursor, mas também na presença de vitiligo (FLEURY et al., 2000a; SELTENHAMMER et al., 2003).

Há três padrões clínicos de crescimento de lesões melanocíticas: (1) crescimento lento por muitos anos, sem haver metástase (mais comuns); (2) crescimento lento inicial com subsequente aumento da taxa de crescimento após alguns anos e (3) crescimento rápido e maligno desde seu início (raro) (ROEL et al., 2000; SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002; SELTENHAMMER et al., 2003).

Os sinais clínicos vão desde interferência com bridão, freios e sela, a lesões obstrutivas mais sérias nos tratos urogenital e gastrintestinal, progredindo para metástases pulmonares e viscerais (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Em geral, autores distinguem neoplasias melanocíticas de equinos em benignas ou malignas por microscopia. Apesar de a classificação ser bem caracterizada em humanos e cães (GROSS; IHRKE; WALDER, 1992; BARNHILL; PIEPKORN; BUSAM, 2003), as classificações extrapoladas feitas para equinos em melanoma benigno ou maligno, ou melanocitoma juncional ou dérmico, não são adequadas (VALENTINE, 1995). Diversas classificações foram sugeridas:

Valentine (1995) sugeriu que há pelo menos quatro possíveis neoplasias melanocíticas de equinos, sendo três de potencial metastático. Os melanomas dérmicos geralmente estão localizados em derme profunda, com presença de células tumorais pequenas, solitárias, homogêneas, indistintas, epitelióides ou dendríticas. Possuem cromatina condensada e densa pigmentação citoplasmática, sem nenhuma figura de mitose aparente. A melanomatose dérmica que apresenta três ou mais lesões, frequentemente coalescentes em cavalos tordilhos com mais de 15 anos de idade, não curáveis cirurgicamente com maior probabilidade de desenvolvimento de metástase, suas características histopatológicas são semelhantes as do melanoma dérmico (VALENTINE, 1995).

A terceira categoria refere-se ao melanoma anaplásico, composto por camada de células epitelióides extremamente pleomórficas, com invasão do epitélio por células isoladas (disseminação pagetóide), pouca pigmentação e numerosas figuras de mitose. Pode ser visto em animais idosos e não tordilhos. Apesar de raro, é o mais agressivo, levando à morte em meses (VALENTINE, 1995).

A quarta categoria é o nevo melanocítico, uma lesão benigna, pigmentada, localizada na derme superficial ou junção dermoepidérmica com frequente envolvimento epitelial, aglomerados distintos relativamente grandes, pleomorfismo de baixo a moderado, células tumorais com formato epitelióide ou fusiforme com núcleo eucariótico, presença de células binucleadas ocasionais, pigmentação

citoplasmática variável e figuras de mitose ocasionais. Ocorre predominantemente em cavalos com menos de seis anos de idade (VALENTINE, 1995).

Roels et al. (2000) sugeriu a classificação das neoplasias melanocíticas de equinos de acordo com as características morfológicas em melanoma metastático maligno ou melanoma benigno. Esta classificação baseou-se na localização e nos seguintes indicadores citológicos de malignidade: pleomorfismo nuclear, hipercromasia nuclear, figuras de mitose e natureza infiltrativa. Células tumorais fusiformes entremeadas em fascículos ou células epitelióides arrançadas e agrupamentos foram as mais encontradas. Os tumores com populações mistas foram classificados separadamente. Todos os tumores melanocíticos benignos apresentaram células epitelióides. Os metastáticos eram um de células mistas e outro com células fusiformes e, a maioria dos tumores apresentava componentes inflamatórios, consistentes com linfócitos. Os granulócitos neutrofilicos também foram vistos em alguns tumores, geralmente associados com ulcerações e necroses (ROELS et al., 2000)

Outra classificação, sugerida por Seltenhammer et.al. (2004) em um estudo comparativo de lesões melanocíticas equinas e humanas, identificou três tipos de lesões melanocíticas cutâneas em equinos: melanomas dérmicos benignos de cavalos tordilhos, melanomas dérmicos malignos de cavalos tordilhos e melanomas anaplásicos malignos de cavalos não tordilhos. Histologicamente, os tipos celulares distinguiram-se em células fusiformes, epitelióides, balonizadas, poliédricas e mistas de epitelióides com fusiformes. Os melanomas de cavalos tordilhos, sendo eles benignos ou malignos, não apresentaram células tumorais melanocíticas na junção dermo-epidérmica, nem na epiderme (SELTENHAMMER et al., 2004).

Os melanomas benignos de cavalos tordilhos possuíam áreas de pigmentação melanocítica intensa intradérmica e subcutânea, com limites bem definidos, comumente observados na proximidade de glândulas sudoríparas apócrinas e outros anexos, sem estarem diretamente conectados. Em sua maioria, apresentavam tipo celular misto com grandes células epitelióides contendo grandes núcleos esferóides, além de células fusiformes e balonizadas também com núcleos grandes e esferóides. Os grânulos de melanina eram grosseiros, com frequente presença de atipia nuclear e, no centro de tumores pigmentados, havia histiócitos com grânulos de melanina bastante pigmentados (melanófagos) associados com apoptose. Poucas figuras de mitose eram vistas no centro dos nódulos tumorais,

como confirmado por imunoistoquímica de marcadores de proliferação. Os tumores eram negros, homogêneos e, na maioria dos casos, envoltos por uma pseudo-cápsula fibrosa. Melanócitos altamente proliferativos foram encontrados nas margens tumorais mostrando marcada síntese de melanina, lembrando o melanoma humano na fase vertical de crescimento (SELTENHAMMER et al., 2004).

Os melanomas malignos de cavalos tordilhos apresentavam anisocitose e anisocariose, características heterogêneas e crescimento assimétrico. A demarcação tumoral era difusa, com aumento da vascularização em alguns casos. A distribuição da melanina era irregular, indo de áreas amelanocíticas, micro-grânulos esparsos a regiões de pigmentação intensa. Os tumores apresentavam células epitelióides pleomórficas e células balonizadas com núcleos irregulares e numerosas figuras de mitose. Além disso, foi observada a reação do estroma de linfócitos ativados (SELTENHAMMER et al., 2004).

Os melanomas malignos anaplásicos de cavalos não tordilhos apresentavam forte semelhança com os melanomas malignos humanos. O tumor, com limites indistintos e agrupamentos de células poliédricas e epitelióides pleomórficas, apresentavam células tumorais com dois nucléolos de intensa atividade mitótica. O crescimento invasivo e a presença de infiltrados linfoplasmocíticos, ulcerações e invasão vascular foram características encontradas neste tipo tumoral equino (SELTENHAMMER et al., 2004).

A comparação de neoplasias melanocíticas humanas e de cavalos também foi feita por Schoniger e Summer (2009), mas estes utilizaram a classificação humana para caracterizar as lesões de equinos. Foram encontrados casos de neoplasias melanocíticas de equinos classificadas como nevos melanocíticos comuns, lesões intradérmicas, bem delimitadas, não encapsuladas, simétricas e em relevo, com múltiplas ilhas de estroma pálido mixomatoso, ninhos de células com apenas um formato e ninhos mistos (tanto de células fusiformes como epitelióides). A maioria das células neoplásicas apresentava um único núcleo redondo a alongado com cromatina pontilhada e citoplasma pouco volumoso contendo ocasionalmente alguns grânulos marrons compatíveis com melanina. O tumor apresentava pouca anisocitose, anisocariose e pleomorfismo celular. Alguns tumores, no entanto, apresentaram algumas células neoplásicas com atipia evidente com pequena a moderada variação no tamanho do núcleo e formato e/ou dois ou três núcleos (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009). Casos classificados como nevos azuis celulares

eram massas intradérmicas bem delimitadas, não encapsuladas, simétricas, compostas por células neoplásicas fusiformes, epitelióides ou alongadas e células dendríticas, arranjadas em fascículos entrelaçados, separados por fibras colágenas. Todos os tumores estavam localizados na derme reticular, alguns indo em direção à derme papilar. Cada célula tumoral apresentava um núcleo ovóide e quantidade moderada de citoplasma de eosinofílico a claro. O núcleo apresentava cromatina pontilhada, podendo haver dois a três nucléolos basofílicos. Havia pouca anisocitose, anisocariose e pleomorfismo. Na maioria dos tumores a média de mitoses era uma figura de mitose por campo (aumento de 40x). Os tumores apresentavam pigmentação citoplasmática variada (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009).

Fleury et al. (2000a) examinaram lesões precoces de neoplasias melanocíticas em cavalos tordilhos e encontraram dois subconjuntos distintos: 1) lesões com aparência de placas que apresentavam proliferação melanocítica atípica ao redor das glândulas sudoríparas, e 2) lesões nodulares com disposição concêntrica das células tumorais e melanófagos. Constatou-se que, diferente dos melanomas humanos, lesões precoces de neoplasias melanocíticas cutâneas em equinos ocorrem primeiro na derme que está intimamente associada com o apêndice epidérmico, mas não na junção dermoepidérmica, e que nesses cavalos, os melanomas crescem como processos auto-limitantes regulados por melanófagos que poderiam contribuir para sua regressão (FLEURY et al., 2000a; SELTENHAMMER et al., 2004).

2.2 GÊNESE DO MELANOMA

Os melanócitos são células dendríticas produtoras de melanina, derivados de melanoblastos neuroectodérmicos provenientes da crista neural, que migraram durante a embriogênese para a epiderme, derme e outros locais (HARGIS, 1998; SMITH; GOLDSCMITH; MCMANUS, 2002). São células isoladas, encontradas na camada basal da epiderme, intercaladas com queratinócitos. Formam junções

aderentes e regulatórias com cinco a oito queratinócitos da vizinhança através de moléculas de adesão (E-caderinas) (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2002).

A melanogênese ocorre em melanossomos, organelas delimitadas por membranas, que utilizam a tirosina como substrato, convertendo-se em dopa e dopaquinona pela tirosinase (HARGIS, 1998). A melanina não fica retida no melanócito normal, sendo transferida a partir dos processos dendríticos do melanócito para os queratinócitos adjacentes, na forma de melanossomos, por um mecanismo de endocitose (OHMURO et al., 1993). Os melanossomos são dispostos sob a forma de capuz sobre o núcleo dos queratinócitos, ajudando a protegê-los da luz ultravioleta. Os fatores que influenciam a melanogênese são: genes, radiação ultravioleta (de maior importância em humanos), idade, temperatura e inflamação (HARGIS, 1998).

O crescimento dos melanócitos é controlado pelos queratinócitos através da comunicação extracelular feita por fatores de crescimento parácrinos, comunicação intracelular por segundos mensageiros e sinais de transdução e, por comunicação intercelular de moléculas de adesão célula-célula, célula-matriz e *gap junctions* intercelulares (HAASS et al., 2005).

Para proliferar, os melanócitos precisam se desacoplar da membrana basal e dos queratinócitos, retrair seus dendritos, se dividir e migrar ao longo da membrana basal antes de finalmente se unirem a matriz e ao queratinócito para formar outra unidade de melanina epidérmica (HAASS et al., 2005).

Em condições normais, a homeostasia determina se a célula permanece quiescente, prolifera, se diferencia ou sofre apoptose. A perda da homeostasia pode perturbar o equilíbrio da unidade epidérmica de melanina e desencadear a proliferação continuada dos melanócitos, o que pode levar ao desenvolvimento de melanoma (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

A conversão de melanócitos normais em neoplásicos é um processo de múltiplas etapas, que tem como primeiro evento a iniciação, seguida pela promoção, transformação e metástase (MEIER et al., 1998).

Praticamente nada se sabe sobre a iniciação de neoplasias melanocíticas na maioria dos animais, mas em humanos e na maioria das neoplasias melanocíticas diagnosticadas em caprinos da raça Angorá acredita-se que a iniciação de aproximadamente 65% dos melanomas cutâneos ocorre secundariamente a mutações geradas por radiação solares UVA e UVB (SLOMINSKI et al., 2001;

SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002). Porém, devido à ocorrência frequente em áreas não expostas à luz solar, pode-se dizer que a exposição a esta não é fator de risco primário para o aparecimento de neoplasias melanocíticas em equinos (FLEURY et al., 2000b).

Acredita-se que, em alguns casos, haja susceptibilidade genética de raças em determinadas espécies, resultando em maior frequência de células mutadas espontaneamente, o que pode contribuir para o processo de iniciação (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Lesões precursoras benignas e pigmentadas também podem contribuir para a iniciação de uma pequena porcentagem de casos de neoplasia melanocítica em humanos e, a categoria mais importante destas lesões são os nevos displásicos. Quanto maior o número destes num indivíduo, maior o risco de desenvolvimento de melanoma. Outra lesão precursora de humanos é o nevo melanocítico congênito gigante (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Em geral, com exceção de cavalos tordilhos, a transformação maligna de lesões benignas não é comum em animais, e acredita-se que a maioria das neoplasias melanocíticas surge *de novo* de melanócitos na epiderme, derme, epitélio ocular e epitélio oral (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

A transição de lesões benignas em malignas ocorre através de um processo que envolve mudanças na expressão e função dos oncogenes ou genes supressores tumorais, assim como mudanças que proporcionam às células tumorais habilidade de superar a adesão célula-célula e controles micro-ambientais do hospedeiro, com o intuito de invadir tecidos adjacentes e colonizar locais distantes (LI; SATYAMOORTHY; HERLYN, 2002).

Os pontos principais de formação de um tumor sólido são: descontrole da proliferação, desarranjo celular e diferenciação morfológica, invasão e metástase para órgãos distantes. Estas características podem ser em parte, atribuídas a alterações na adesão e comunicação entre células neoplásicas e normais no seu microambiente (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O mecanismo molecular exato desta desordem no melanoma ainda é desconhecido. No entanto, acredita-se que as células do melanoma escapem do controle dos queratinócitos através da diminuição da regulação de receptores importantes para a comunicação e adesão com queratinócitos (ex. E-caderina), aumento da regulação de receptores e moléculas sinalizadoras não encontradas nos melanócitos, mas importantes para interações

melanoma-melanoma e melanoma-fibroblastos (ex.: N-caderina e Mel-CAM) e, perda da ancoragem à membrana basal pela expressão alterada de ligantes extracelular-matriz da família das integrinas (HAASS et al., 2005).

O próximo passo no desenvolvimento do melanoma requer um ou mais fatores de promoção possivelmente agindo por efeito epigenético com consequente ruptura da comunicação intercelular de *gap junctions*. Estes fatores de promoção estimulam a proliferação de células mutadas, permitem o aumento da população celular, persistência da mutação e promovem oportunidades para mutações adicionais. Os promotores podem ser: trauma crônico, exposição química, queimaduras, hormônios, infecções, droga e outras causas que resultam em hiperplasia (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Com o início da instabilidade genética ou ambiental do DNA, há maior facilidade de haver transformações neoplásicas subsequentes, que geram mutações antes do desenvolvimento de metástase (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

Supressores de proliferação celular e ativadores de apoptose, como a proteína Retinoblastoma (Rb) e p53, respectivamente, são eventualmente ultrapassados por fatores de crescimento e/ou receptores de fatores de crescimento desregulados, e inibidores de apoptose (bcl-2) (SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

A parada do ciclo celular ou a apoptose, desencadeados por p53, permitem o reparo de mutações no DNA ou eliminação da células danificada em qualquer linhagem celular. Mutações no gene p53 podem impedir a síntese da proteína p53 ou resultar em p53 anormal, que não consegue entrar no núcleo para exercer sua função, resultando na perpetuação das mutações no DNA. Portanto, as atividades de p53 e Rb, são essencialmente sabotadas na maioria das neoplasias melanocíticas por mutações em genes que codificam proteínas intrínsecas a essas vias regulatórias (TIETZE; CHIN, 2000).

A metástase por si só é um processo com múltiplas etapas que começa com o destacamento das células do tumor primário, sua movimentação pelo endotélio, transporte através de vasos sanguíneos e/ou linfáticos, adesão e diapedese através do endotélio e finalmente adesão e proliferação em um local secundário. As células tumorais devem desativar e depois ativar várias moléculas de adesão, como caderinas e CD44 (MEIER et al., 1998).

2.3 MARCADORES TUMORAIS USADOS NO DIAGNÓSTICO DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS

O diagnóstico das lesões pigmentadas pode ser feito por exame anatomopatológico em cortes histológicos de rotina, corados com Hematoxilina e Eosina, na maioria dos casos (CROTTY; MCCARTHY; MIHM, 2004). Critérios morfológicos como assimetria, perda de circunscrição, disseminação pagetóide intraepidérmica, presença de atipia citológica, aumento de celularidade, ausência de maturação e/ou figuras de mitose dérmicas são úteis para a distinção entre nevos melanocíticos benignos e melanomas (KIRKHAM, 2000; CERRONI; KERL, 2001), porém, deve-se levar em conta o conjunto de características morfológicas, uma vez que uma característica avaliada isoladamente pode ser insuficiente para o diagnóstico correto.

Diagnósticos equivocados de melanoma são uma das causas mais comuns de casos de má conduta na medicina humana. Portanto, não há dúvidas de que algumas proliferações melanocíticas são de difícil classificação, e necessitam de técnicas, como a imunoistoquímica, que auxiliem em seu diagnóstico. Seu uso tem grande utilidade em diversas situações de dificuldade diagnóstica, como segue: melanomas metastáticos podem imitar carcinomas, linfomas, ou outros tumores indiferenciados; melanomas de células fusiformes podem ser indistinguíveis morfológicamente de variantes de carcinomas de células fusiformes ou fibrohistiocitomas malignos superficiais (Fibroxioma atípico); melanomas *in situ* residuais em locais anatômicos de alto risco como pele lesionada pelo sol, palmas das mãos e solas dos pés; melanose *versus* melanoma e a identificação de pequenos depósitos de células de melanoma em locais de regressão; melanoma *versus* carcinoma de células claras de partes moles; nódulos proliferativos em nevos congênitos *versus* melanoma; melanomas semelhantes a nevos de Spitz (Melanoma Spitzóide); e identificação de micrometástases em linfonodos sentinela (JACKSON, 1997; TROXEL, 2003).

Os anticorpos contra vimentina e proteína S100, usados para auxiliar no diagnóstico de melanoma, marcam virtualmente todos os melanomas e nevos melanocíticos, mas não são específicos para proliferação melanocítica. Anticorpos para proteínas relacionadas à melanogênese como HMB-45, tirosinase, TRP-1 e Mel5; e antígenos de diferenciação de melanócitos Mart-1/Melan-A e MITF são os

mais específicos para células de linhagem melanocítica, marcando raramente tumores não-cutâneos, não-melanocíticos (BUSAM, 2004; OHSIE et al., 2008).

2.3.1 Anticorpos para melanócitos

O anticorpo contra a proteína S100 foi um dos primeiros e mais usados marcadores para melanoma maligno. Faz parte do grupo das proteínas que se ligam ao cálcio (ZIMMER et al., 1995) e sua família é composta por 21 membros. O primeiro membro foi isolado originalmente por Moore (1965) como uma fração de proteína de tecido cerebral de bovino e definido como específico para cérebro. Esta fração de proteína foi denominada S100 devido a sua solubilidade de 100% em solução de sulfato de amônio com pH neutro.

Em 1981, Gaynor et al. reconheceram a presença da proteína S100 em células de melanoma, levando à sua aplicação como indicador diagnóstico para este tumor (GAYNOR et al., 1981), outras funções também foram identificadas, como seu envolvimento na regulação do ciclo celular e divisão celular (ZIMMER et al., 1995), e comunicação célula-célula (SVIATOKHA et al., 2010).

A proteína S100 é composta por subunidades α e β , possibilitando três formas diméricas, sendo apenas a α - α sintetizada por melanócitos (KLIGMAN; HILT, 1988). A maioria dos laboratórios, porém, utiliza o anticorpo policlonal, que reconhece as três formas da proteína, promovendo alta sensibilidade, porém, baixa especificidade, uma vez que outros tecidos e tipos tumorais podem apresentar positividade ao anticorpo (MOORE, 1965). Em humanos, é esperado que o S100 policlonal apresente positividade de aproximadamente 100% de todos os tumores melanocíticos (BLESSING; SANDERS; GRANT, 1998), mas há casos com marcação negativa (ARGENYI et al., 1994). Dos tumores amelanocíticos 89% são positivos para S100a tanto em humanos como animais (PALMER; HALL; LEW, 1985; SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1985; KOENIG et al., 2001). Há relação positiva de marcação para S100 com o potencial metastático e células de melanoma (DONATO, 2001).

Por ser uma proteína que se liga ao cálcio intracelular e intranuclear, a imunorreatividade para S100 deve ser tanto nuclear como citoplasmática, para que seja válida. Esta proteína está presente nos dois compartimentos celulares em melanócitos normais e neoplásicos (HERRERA et al., 1994).

Diversos anticorpos monoclonais têm surgido contra um grupo antigênico glicoproteínico restrito a células de linhagem melanocítica. Este grupo é conhecido como gp100/PMel17 (ADEMA et al., 1994; BROUWENSTIJN et al., 1997) e, localiza-se na membrana interna dos pré-melanossomos tipos 1, 2 e 3, servindo de alvo potencial para linfócitos T citotóxicos (KAWAKAMI et al., 1993; BUSAM et al., 1998). A análise da sequência de nucleotídeos do grupo mostrou que os cDNAs para gp100 e PMel17 provém de um único gene, por *splicing* alternativo (ADEMA et al., 1994) e são expressos de maneira consistente e concomitante por populações melanocíticas neoplásicas e não neoplásicas (ADEMA et al., 1993). Os anticorpos deste grupo incluem NKI-beteb, NKI/C3, HMB-45, HMB-50 e MART-1/Melan-A, que demonstram vários níveis de especificidade e sensibilidade para melanócitos, nevos e melanomas (ESCLAMADO, GOWN, VOGEL, 1986; GOWN et al., 1986; SKELTON et al., 1991; SMOLLER; HSU; KRUEGER, 1991; ADEMA et al., 1994; ADEMA et al., 1996; CHEN et al., 1996). O grupo gp100/PMel17 equino foi clonado e sequenciado (GenBank AF076780), tendo homologia de 84,1% com gp100/PMel17 murino (GenBank U14133) e 86.7% com seu homólogo humano (Genbank M77348). Nenhuma diferença foi encontrada na sequência de nucleotídeos analisados em equinos de diferentes pelagens, acometidos e não acometidos por lesões melanocíticas (RIEDER et al., 2000).

O HMB-45 e o MART-1/Melan-A têm sido os mais usados para confirmar neoplasias positivas para S100 como sendo de natureza melanocítica, e não manifestam reatividade cruzada em marcações com entidades patológicas. Porém, existe uma exceção quanto ao MART-1/Melan-A, que consiste na marcação de células tumorais de uma classe de carcinomas adrenocorticais e tumores dos cordões sexuais gonadais, provavelmente devido ao reconhecimento de um epítipo antigênico na proliferação esteroideogênica que é compartilhado com as moléculas do grupo gp100/PMel 17 (BUSAM et al., 1998; BUSAM; JUNGBLUTH, 1999). Apesar de HMB-45 e MART-1/Melan-A serem mais específicos para melanoma, eles são menos sensíveis, e a coloração é frequentemente desigual, dependendo da técnica (SUNDRAM et al., 2003).

O MART-1/Melan-A tem marcação variável dependendo do tipo de lesão em humanos (HOFBAUER et al., 1998; BERGMAN et al., 2000). Há relatos de melanócitos normais exibirem marcação mais homogênea e maior porcentagem de células positivas para MART-1/Melan-A que melanócitos malignos ou células metastáticas (KAGESHITA et al., 1997; JUNGBLUTH et al., 1998), também há estudos em que se observa maior intensidade de marcação em melanomas epitelióides que fusiformes (BUSAM et al., 1998; JUNGBLUTH et al., 1998), apesar de haver os que não evidenciam tal diferença (KOENIG et al., 2001)

O HMB-45 é útil na identificação de neoplasias melanocíticas e, mais de 90% dos melanomas malignos humanos são positivos para este marcador (SKELTON et al., 1997).

2.3.2 Anticorpos de proliferação celular

Mensurações de proliferação tumoral apresentam boa correlação com o comportamento biológico de neoplasias em humanos, fornecendo informações prognósticas adicionais valiosas. O PCNA e Ki-67 têm sido propostos como parâmetros cinéticos intrínsecos celulares com potencial valor prognóstico em tumores de humanos e animais (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999; ROELS et al., 2000; SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002).

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal que reconhece um antígeno nuclear associado à proliferação celular (GERDES et al., 1984). O antígeno Ki-67 está presente no núcleo das células em todas as fases da proliferação celular (G_1 , S, G_2 e M), porém, encontra-se ausente em G_0 e células na fase inicial de G_1 (GERDES et al., 1983; LI et al., 1999). Seu uso é frequente para a determinação da fração de crescimento em diferentes tumores (SCHOLZEN; GERDES, 2000), incluindo os de origem melanocítica (WOLLINA et al., 1991).

Diversos estudos, em humanos, descrevem a taxa de proliferação celular mensurada pela expressão de Ki-67 como tendo valor prognóstico em melanomas (HERNBERG et al., 1998; GOULD ROTHBERG; BRACKEN; RIMM, 2009), além de seu auxílio na distinção de tumores melanocíticos benignos de malignos (KANTER

et al., 1995; KANTER-LEWENSOHN et al., 1997; SVIATOKHA et al., 2010). Em melanomas malignos, há correlação direta de Ki-67 com a espessura tumoral, potencial metastático e prognóstico (RAMSAY et al., 1995; VOGT et al., 1997; KALEEM et al., 2000). No entanto, em estudos com tumores de maior espessura, não foi encontrada correlação entre a expressão de Ki-67 e a evolução da doença (REDDY et al., 1995; TALVE; COLLAN; EKFORSS, 1996; HAZAN et al., 2002). Moretti et al. (2001) demonstraram uma correlação diferente da expressão de Ki-67 e prognóstico de acordo com a espessura do tumor. Em tumores primários, há relatos de expressão de Ki-67 de baixa a moderada, não tendo valor prognóstico na análise de sobrevida humana (ILMONEN et al., 2005).

O PCNA é um polipeptídeo nuclear de 36 kD essencial para o metabolismo do ácido nucléico, sendo componente do mecanismo de replicação e reparo celular. Ele funciona como proteína acessória da DNA polimerase delta, que tem papel no direcionamento da síntese da fita de DNA, durante a fase S do ciclo celular. É produzido na fase tardia de G1 e na fase S, mas é detectável em todo o ciclo celular devido a sua meia-vida longa, que tem duração de 20 horas (KELMAN, 1997). Seu gene é conservado dentre diferentes espécies animais (SCHILLER et al., 2003).

2.3.3 A proteína p53

Há diversas alterações genéticas correlacionadas diretamente com o desenvolvimento tumoral, e a maioria delas pertence a uma das três categorias de genes: protooncogenes, genes supressores tumorais ou genes de reparo de DNA. Os protooncogenes atuam como reguladores de crescimento cruciais na divisão normal da célula, enquanto os genes supressores tumorais atuam como reguladores negativos de crescimento.

O gene supressor tumoral TP53 codifica a proteína p53, que é um fator de transcrição cuja expressão bloqueia a progressão de células da fase G1 para a S do ciclo celular (BAKER et al., 1990), estando envolvida na parada do ciclo celular e ativação da apoptose (HARTWELL; WEINERT, 1989; LANE, 1992). A atividade de

p53 é perdida em diversas neoplasias, e em mais da metade é inativada como consequência de mutação ou deleção deste gene (HOLLSTEIN et al., 1991). Devido à proteína p53 aparecer como um passo comum nas neoplasias em humanos, muitos estudos têm sido direcionados para o seu entendimento, e sequências de homologias semelhantes têm sido descritas entre espécies mamíferas (SOUSSI; CARON DE FROMENTEL; MAY, 1990), inclusive entre o p53 canino, equino e humano (NASIR; REID, 1995; BUCHER et al., 1996; NASIR et al., 1997; VELDHOFEN; MILNER, 1998).

Em humanos, sabe-se que o melanoma é uma das neoplasias onde o p53 ainda é selvagem, indicando que outros eventos contribuem para a inativação de p53. O gene é mantido inativo e em níveis baixos predominantemente por Mdm2, a principal ubiquitina ligase E3 que se liga diretamente ao p53 e o ubiquitina para subsequente degradação (IWAKUMA; LOZANO, 2007). Vários sinais são responsáveis pela ativação de p53, são eles: dano no DNA, oncogênico, genotóxico e estresse oxidativo, levando à indução de genes pro-apoptóticos (BAX, PUMA), reguladores do ciclo celular (p21 e GADD45) ou genes de senescência, dependendo da intensidade do sinal e tipo celular (LOZANO; ZAMBETTI, 2005; RILEY et al., 2008). Nas células tumorais, a pressão seletiva para inativar p53 é muito alta. Isto ocorre principalmente através de mutações em TP53, amplificação ou expressão aumentada de seus inibidores Mdm2, Mdm4 (membro da família Mdm2) e perda ou inativação de ativadores sequenciais como p14^{ARF} (p19^{ARF} em camundongos) e p16^{ink4a} (TOLEDO; WAHL, 2006). Diferentes combinações destes eventos têm como objetivo diminuir ou abolir os níveis de p53 selvagem e a atividade que leva à apoptose defeituosa, proliferação descontrolada e transformação celular. Assim, a inativação de p53 ou deleção podem cooperar com a deleção ou expressão aumentada de Mdm2, deleção de p16^{ink4a}, ou p19^{ARF} para promover a tumorigênese (SHARPLESS et al., 2001; BOX, TERZIAN, 2008; TERZIAN et al., 2008).

Observou-se baixa frequência (0-10%) de mutações ou perda de heterozigose do gene TP53 em melanomas humanos (BOX, TERZIAN, 2008), sendo grande parte das mutações causadas por radiação ultravioleta (HOCKER; TSAO, 2007). A proteína p53 foi estudada através de imunoistoquímica, e concluiu-se que tanto a intensidade de marcação como o número de células positivas aumentam com a progressão tumoral do melanoma humano (ALBINO et al., 1994; POREMBA et al., 1995; SPARROW et al., 1995b; ESSNER et al., 1998). Altos níveis de RNAm de p53

sugerem que a superexpressão de TP53 pode ser um mecanismo que explica o nível aumentado da proteína (WEISS et al., 1995), porém, devido à baixa frequência deste evento, pode-se assumir que a estabilidade da proteína prevalece. Como os níveis de estabilidade de p53 selvagem são associados com um melhor prognóstico, pacientes com melanoma superficial mostraram período livre de doença maior e melhor sobrevida global quando não houve mutação de p53 (FLØRENES et al., 1994). Em contrapartida, estudos sugeriram que a expressão aumentada de p53 pode estar associada com um prognóstico pior (MCGREGOR et al., 1993; SPARROW et al., 1995a). Em cães a proteína p53 não foi detectada em células melanocíticas neoplásicas, mas ela estava presente em células normais (RITT; WOJCIESZYN; MODIANO, 1998).

2.4 O MICROARRANJO DE TECIDOS (*TISSUE MICROARRAY - TMA*)

O conceito de diversos tecidos em um único bloco de parafina, para avaliação simultânea, foi primeiramente descrito por Battifora (1986), que descreveu um método em que rodela espessas, de diferentes tecidos, envoltas por intestino e posteriormente incluídas em um bloco de parafina, o chamado *sausage block* (BATTIFORA, 1986). Wan et al. (1987) desenvolveram o formato de arranjo, que foi aprimorado por Kononen (1998), através da criação de um dispositivo para a construção rápida e precisa dos microarranjos de tecidos, possibilitando sua execução em laboratórios de patologia.

Sua utilização pode ser para estudos com marcadores histoquímicos, imunoistoquímicos, FISH ou RNA ISH (KALLIONIEMI et al., 2001; NOCITO et al., 2001b; HSU et al., 2002; SKACEL et al., 2002; SHERGILL et al., 2004).

As vantagens obtidas com esta técnica são: (1) amplificação de tecidos escassos, uma vez que conseguimos retirar fragmentos do bloco em questão e arranjá-los em diferentes TMAs; (2) análise simultânea de grande número de espécimes em uma mesma lâmina, podendo chegar a mil tecidos diferentes em uma mesma lâmina; (3) uniformidade experimental, pois cada amostra de tecido é tratada de maneira idêntica, sendo a padronização igual para todos tecidos; (4) menor

número de reações, economia de tempo e custos, devido às técnicas serem feitas em apenas uma lâmina, com menor necessidade de mão de obra e menor gasto com reagentes; (5) não destrói o bloco original, são retirados pequenos fragmentos dele, sem comprometer a integridade do bloco, para que possa ser retornado ao paciente ou instituição, se necessário; (6) facilitar na padronização de técnicas laboratoriais; (7) utilização no controle interno e positivo de reações e (8) possibilidade de maior rapidez nas descobertas moleculares e possíveis aplicações clínicas (KALLIONIEMI et al., 2001; HSU et al., 2002; SHERGILL et al., 2004; JAWHAR, 2009).

A principal desvantagem quanto ao uso do TMA consiste na sua representatividade para tumores heterogêneos. Porém, um estudo demonstrou que, através da comparação qualitativa dos resultados de blocos inteiros de tecido com os TMAs, há concordância em 96% dos casos (HSU et al., 2002). Outro estudo demonstrou que a análise imunoistoquímica de duas amostras teciduais de um mesmo bloco doador é comparável à análise de secções de todo o tecido em mais de 95% dos casos (CAMP; CHARETTE; RIMM, 2000). Estes achados demonstram que a heterogeneidade intratumoral não é um impedimento principal no uso de TMA (KALLIONIEMI et al., 2001; JAWHAR, 2009).

Diversos autores têm utilizado esta técnica para o estudo de alterações gênicas e expressão de diversas proteínas envolvidas na gênese, progressão, invasão e capacidade de produzir metástase de melanomas humanos primários de tipos histológicos variados e em diversos estágios, melanoma metastático e metástases (ALONSO et al., 2004; PACIFICO et al., 2005; NAZARIAN et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Os objetivos estão dispostos nos tópicos a seguir:

3.1 OBJETIVO GERAL

Análise imunoistoquímica e anatomopatológica em lesões cutâneas de neoplasias melanocíticas de equinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever os aspectos anatomopatológicos de lesões melanocíticas equinas.
2. Estudar a expressão dos marcadores convencionais utilizados para diagnosticar o melanoma humano S-100, Melan-A, HMB-45, Ki-67, PCNA, e p53 por imunoistoquímica em cortes de microarranjo de tecidos.
3. Correlacionar os dados anatomopatológicos com os imunoistoquímicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos estão dispostos nos seguintes tópicos:

4.1 INFORMAÇÕES DOS ANIMAIS EM ESTUDO

Os dados dos animais em estudo foram fornecidos pela Veterinária Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles-Gomes para a análise de variáveis demográficas (raça, sexo, idade, pelagem e localização do tumor).

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Animais cujo diagnóstico prévio de lesão melanocítica foi realizado por um Médico Veterinário, com blocos de parafina disponíveis, que contivessem material suficiente para o estudo. Foram excluídos materiais com fixação inadequada ao exame histopatológico.

4.3 MÉTODO

Os métodos do presente trabalho estão dispostos a seguir:

4.3.1 *Análise Morfológica*

Os blocos incluídos em parafina foram cortados individualmente em secções de 5 µm de espessura para a confecção de lâminas e subsequente coloração através da técnica de Hematoxilina e Eosina para a análise morfológica das lesões. Esta avaliação foi feita através da observação, em microscópio óptico, de características celulares, pigmentares, nucleares, de nucléolo, de melanófagos, presença de invasão e necrose.

Foram avaliadas as seguintes características celulares:

Quantidade de células tumorais: classificada em baixa, moderada ou alta.

Distribuição das células neoplásicas: classificada em difusa, em ninhos, em feixes, difusa e em feixes ou todas as anteriores.

Índice mitótico: avaliado na área de maior concentração de mitoses.

Tipo celular: classificado em fusiforme, epitelióide ou ambas.

Quanto às características pigmentares, observamos:

Intensidade: classificada em baixa, moderada ou alta.

Distribuição: em difuso ou ao redor de áreas de maior celularidade.

Localização: em derme, hipoderme, derme e hipoderme ou em derme com hipoderme não avaliável devido à profundidade da biópsia realizada.

As características nucleares observadas foram:

Atipia: classificada em discreta, moderada ou intensa.

Formato do núcleo: classificado em alongado, arredondado ou ambos.

Características da cromatina: classificada em grumosa, dispersa ou ambas.

Multinucleação: presente ou ausente.

Nucléolos: foram avaliados quanto a sua proeminência como proeminente, não proeminente ou não avaliável; e quanto à quantidade em múltiplos ou únicos.

Outros parâmetros foram avaliados como segue:

Quanto aos melanófagos, foi avaliada a intensidade destas células nas biópsias tumorais em baixa, moderada ou alta; e sua localização em difusa, na

presença ou ausência de células neoplásicas em vasos sanguíneos, linfáticos e ao redor de nervos. A presença de necrose foi classificada em menos de 50 por cento ou mais de 50 por cento do tecido.

4.3.2 Classificação das lesões melanocíticas

As lesões melanocíticas foram diagnosticadas segundo o critério de classificação sugerido por Valentine (1995), descrito acima.

4.3.3 Construção e análise do microarranjo de tecidos

Confecção do bloco de parafina de TMA

O bloco de TMA foi confeccionado com cilindros de um milímetro de diâmetro de 25 amostras de tumores que correspondem a neoplasias melanocíticas de 25 equinos representados em quadruplicata, quando havia pouco material fazia-se duplicata. Também foram incluídas amostras de tecido sabidamente positivas para os anticorpos em questão, que serviram como controle positivo das reações imunoistoquímicas. Utilizou-se um cilindro de tecido placentário para orientação inicial da sequência dos casos utilizados. Esta técnica foi primeiramente descrita por Kononem et al. (1998), e consiste no transporte de cilindros de tecido de um bloco original (doador) para um receptor, em que diversas amostras de diferentes tecidos são incluídas para a análise conjunta. São feitas lâminas coradas em HE dos blocos doadores, marcadas com caneta para guiar na punção do local exato deste bloco para a confecção do TMA (Figuras 1 e 2).

Figura 1 – Fotografia do bloco e lâmina do TMA de neoplasias melanocíticas equinas

Figura 2 – Fotografia em microscópio óptico (10x) de lâmina corada por HE representando uma amostra de cilindro de um milímetro de diâmetro do TMA

Confecção das lâminas de vidro

A partir do bloco de TMA foram preparados 30 cortes histológicos seriados em lâminas de vidro para imunistoquímica (Starfrost®), na espessura de 3 µm.

As lâminas 01 e 30 foram coradas com Hematoxilina e Eosina para controle da representatividade do material. As lâminas de 02 a 07 foram utilizadas para reação de imunistoquímica para Ki-67, PCNA, p53, S100, Melan-A e HMB-45. Através de uma planilha realizada em Excel® (Windows® – Microsoft® Office) foi possível localizar cada caso nas lâminas do TMA (Figura 3).

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	mm
0	Placenta	GV-0023	GV-0023	GV-0023	GV-0023	GV-0024	GV-0024	GV-214	GV-214	GV-214	GV-214	GV-131	GV-131	GV-131	GV-131	GV-157	0
12	GV-157	GV-181	GV-181	GV-181	GV-181	GV-183	GV-183	GV-183	GV-183	GV-250	GV-250	GV-250	GV-250	GV-249	GV-249	GV-249	12
24	GV-249	GV-485	GV-485	GV-485	GV-485	GV-816	GV-816	GV-816	GV-816	GV-907	GV-907	GV-1270	GV-1270	GV-1270	GV-1270	GV-1521	24
36	GV-1521	GV-1521	GV-1521	GV-1749	GV-1749	GV-1749	GV-1749	GV-1755	GV-1755	GV-1755	GV-1755	GV-1988	GV-1988	GV-1988	GV-1988	GV-2045	36
48	GV-2045	GV-2045	GV-2045	GV-2053	GV-2053	GV-2305	GV-2305	GV-2305	GV-2305	B9-13	B9-13	B9-13	B9-13	B9-14	B9-14	B9-14	48
60	B9-14	1202-H6	1202-H6	1202-H6	1202-H6	1202-H1	1202-H1	1202-H1	1202-H1	GV-59	GV-59	GV-59	GV-59	GV-2211	GV-2211	GV-2211	60
72	GV-2211																72
84																	84
96	1202-H7	1202-H7	1202-H7	1202-H7	B10-5441	B10-5441	B10-5441	B10-5441	Pele	Pele	Pele	Pele	Linf	Linf	Linf	Linf	96
108																	108
120																	120
132																	132
144																	144
156																	156
168																	168
180																	180
192																	192
204																	204
216																	216
228																	228 mm
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	180	mm
Título: Melanoma Equino																	
Autor: Maria Luísa de Lima Landman																	
Blocos USP									Melanoma Equino		TMA 1.0mm		Setembro.2010				
									Controle								

Figura 3 – Planilha de identificação e localização dos 25 casos analisados no bloco de TMA, juntamente com os controles positivos para os anticorpos

4.3.4 Estudo Imunoistoquímico

A tabela 1 indica os marcadores utilizados no estudo.

Tabela 1 - Relação dos anticorpos utilizados no estudo de neoplasias melanocíticas de equinos

Anticorpo	Tipo	Clone	Origem	Diluição	Fabricante	Código
Anti-S100	Policlonal	-	Coelho	1:800	Dako	Z0311
Anti-Melan-A	Monoclonal	A103	Camundongo	1:10	Dako	M7196
Anti-HMB-45	Monoclonal	HMB-45	Camundongo	1:10	Dako	M0634
Anti-Ki-67	Monoclonal	MIB-1	Camundongo	1:50	Dako	M7240
Anti-PCNA	Monoclonal	PC-10	Camundongo	1:7000	Dako	M0879
Anti-p53	Monoclonal	318-6-11	Coelho	1:100	Dako	M3629

Protocolo de Reações

Anticorpos HMB-45, S100, MELAN-A e PCNA

As lâminas Starfrost® foram submetidas à desparafinização em duas soluções de xilol 100%, por 10 e 5 minutos. A preparação das lâminas foi feita através de passagens sucessivas em etanol por 1 minuto (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita por calor, com a utilização de panela elétrica e solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 por 15 minutos, seguida de resfriamento em água corrente por 5 minutos. Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA-ALDRICH, A9647, USA), por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. As lâminas, então, foram lavadas em tampão PBS com Tween com troca tripla de 5 minutos cada. A incubação das lâminas com o anticorpo secundário anti-camundongo e anti-coelho (EnVision™ G|2 System/AP - LINK), pronto para uso, foi feita durante 30 minutos à temperatura ambiente com posterior lavagem em tampão PBS com Tween com troca tripla de 5 minutos cada. O polímero de amplificação fosfatase alcalina para o kit EnVision™ G|2 System/AP, pronto para uso, foi utilizado por 30 minutos à

temperatura ambiente com posterior lavagem tripla de 5 minutos cada, em tampão PBS. Foram necessários 10µL do cromógeno *Permanent Red*, em 1 mL de tampão substrato adicionado de 40 µL de Levamisol (utilizado para o bloqueio de reações inespecíficas) para a revelação da reação, sendo as lâminas incubadas nesta solução à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a observação do desenvolvimento do precipitado, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merk) por 30 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Por último, as lâminas foram montadas para a leitura. Todas as reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário e substituição por PBS.

Anticorpos Ki-67 e p53

As lâminas Starfrost® foram submetidas à desparafinização em duas soluções de xilol 100%, por 10 e 5 minutos. A preparação das lâminas foi feita através de passagens sucessivas em etanol por 1 minuto (100%, 95% e 70%) e então lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita por calor, com a utilização de panela elétrica e solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 por 15 minutos, seguida de resfriamento em água corrente por 5 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feita com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.), uma vez por 10 minutos, seguida de lavagem em água corrente por 5 minutos. Incubaram-se as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, em tampão PBS, contendo albumina bovina (BSA) a 1% (SIGMA-ALDRICH, A9647, USA), por 1 hora, à temperatura ambiente, em câmara úmida. As lâminas, então, foram lavadas em tampão PBS com Tween com troca tripla de 5 minutos cada. A incubação das lâminas com o anticorpo secundário anti-camundongo e anti-coelho (ADVANCE™ Dako - LINK), pronto para uso, teve duração de 30 minutos à temperatura ambiente e posterior lavagem em tampão PBS com Tween com três trocas de 5 minutos cada. O polímero de amplificação *horseradish peroxidase*, pronto para uso, foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente com posterior lavagem tripla de 5 minutos cada, em tampão PBS. Foram utilizados 20 µL do cromógeno 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Dako – Liquid DAB +

Substrate, K3468), em 1mL de tampão substrato pronto para uso, para a revelação da reação por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a observação do desenvolvimento do precipitado, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris (Merk) por 30 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Foi feita a diafanização em etanol (80%, 95% e 100%), e xilol (três banhos) e subsequente montagem das mesmas para a leitura. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado, e controle negativo, realizado pela omissão do anticorpo primário e substituição por PBS.

4.3.5 Leitura das lâminas

As lâminas de TMA foram analisadas considerando válida a observação de pelo menos vinte e cinco por cento do tecido representado.

Para os anticorpos anti-S100, HMB-45 e Melan-A utilizou-se um método semi-quantitativo considerando a intensidade da marcação e a proporção de células tumorais marcadas (Quadro 1), com base em dados de literatura (BEZDEKOVA et al., 2007; WEN et al., 2010).

S100, HMB-45 e Melan-A - marcação citoplasmática	
Intensidade	Proporção de células marcadas
0 = negativo	0 = 0 a 4%
1 = fraca	1 = 5 a 24%
2 = moderada	2 = 25 a 49%
3 = forte	3 = 50 a 100%

Quadro 1 - Metodologia de determinação dos escores para análise de marcação citoplasmática dos anticorpos anti-S100, HMB-45 e Melan-A

A pontuação final foi determinada através da multiplicação dos escores de intensidade e proporção. A fórmula utilizada para o cálculo deste escore foi:

$$\text{Escore} = \text{Intensidade de marcação} \times \text{Proporção de células tumorais marcadas}$$

Os casos foram classificados em três subgrupos: 0 (zero) com sendo expressão negativa, 1-2 expressão fraca, 3-9 expressão moderada a forte. Também foi feita a análise da positividade dos três anticorpos em conjunto para a verificação do comportamento tumoral frente os anticorpos, podendo sugerir um possível painel de anticorpos para o diagnóstico de neoplasias melanocíticas em equinos.

Para marcadores nucleares (Ki-67, p53 e PCNA) foi feita a contagem dos núcleos das células neoplásicas e a porcentagem de células com expressão positiva aos anticorpos em questão, tentou-se contar o número máximo possível de célula das quatro amostras teciduais dos casos analisados (NOCITO et al., 2001a). O programa utilizado foi o UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.0.

4.3.6 Análise estatística

A descrição dos dados em que foi feita através de porcentagem. Para a avaliação da relação entre as variáveis da análise morfológica e expressão dos marcadores estudados foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para duas e três ou mais categorias, respectivamente. Características de intensidade foram agrupadas em duas categorias para fins estatísticos (baixa, moderada/alta e, discreta, moderada/intensa).

Para todos os testes estatísticos, estabeleceu-se nível de significância $\alpha = 5\%$, ou seja, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Os três anticorpos de melanócitos (S100, HMB-45 e Melan-A) foram observados caso a caso para verificar a porcentagem de casos negativos para os três anticorpos, positivos para um anticorpo, positivos para dois anticorpos e positivos para os três anticorpos.

5 RESULTADOS

Os resultados estão dispostos na forma de tópicos a seguir:

5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram analisados os dados de 25 equinos com diagnóstico histopatológico de neoplasia melanocítica, no período de 2004 a 2010. As raças encontradas neste estudo foram SRD (16/25, 64,0%), Lusitano (6/25, 24,0%), Árabe (2/25, 8,0%) e Sueco (1/25, 4,0%). Os machos representaram a maioria dos animais encontrados (18/25, 72,0%). A faixa etária dos animais variou de 4 a 24 anos (com idade média de 13 anos). A localização tumoral, em sua maioria, encontrava-se em região perianal (13/25, 52,0%), seguida da base da cauda (8/25, 32,0%), prepúcio (2/25, 8,0%) e múltiplas localizações (2/25, 8,0%) (Tabela 2).

Blocos de parafina de todos os animais avaliados apresentaram material suficiente para a inclusão no TMA.

Tabela 2 – Distribuição dos 25 casos analisados de acordo com gênero, raça, idade e localização da lesão melanocítica

Variável	Categoria	n	(%)
Sexo	Macho	18	(72,0)
	Fêmea	7	(28,0)
Raça	SRD	16	(64,0)
	PSL	6	(24,0)
	Árabe	2	(8,0)
	Sueco	1	(4,0)
Idade	< 15 anos	15	(60,0)
	≥ 15 anos	10	(40,0)
Localização do tumor	Região Perianal	13	(52,0)
	Base da Cauda	8	(32,0)
	Região Prepucial	2	(8,0)

5.2 DESCRIÇÃO DA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Na análise morfológica dos tumores predominaram amostras com celularidade moderada (52,0%) e intensa (40,0%). Quanto à distribuição das células tumorais, a disposição concomitante difusa e em feixes (52,0%) foi a mais encontrada, seguida da distribuição em feixes (16,0%), todas as distribuições (16,0%) e da distribuição difusa (12,0%). A maioria dos tumores não apresentou figuras de mitose (96,0%) e houve predomínio de células tanto epitelióides como fusiformes (80,0%). Em se tratando de características nucleares observamos atipia discreta (48,0%) e moderada (44,0%) em sua maioria, assim como núcleos de formato arredondado e alongado em um mesmo tumor (76,0%), e de cromatina dispersa (60,0%). Nenhum núcleo celular apresentou multinucleação. Todas as células apresentaram nucléolos múltiplos e, em sua maioria, não proeminentes (88,0%). Quanto à pigmentação celular dos tumores, houve predomínio de células tumorais com pigmentação intensa (68,0%), seguida de moderada (24,0%). A pigmentação distribuiu-se de forma difusa com localização em derme (100%). Houve alta celularidade de macrófagos em 64,0% dos casos e baixa celularidade em 20,0% dos casos, a localização destes foi em sua maioria difusa (96,0%). Houve apenas um caso com invasão sanguínea, enquanto não foram encontradas invasões linfáticas ou perineurais. Não foram observados sinais de necrose em 64,0% dos tumores (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos 25 casos analisados de acordo com as características morfológicas tumorais

Características Tumorais	Categorias	N	(%)
Celulares			
Celularidade	Baixa	2	8%
	Moderada	13	52%
	Alta	10	40%
Distribuição	Difusa	3	12%
	Difusa com feixes	13	52%
	Em feixes	4	16%
	Em ninhos	1	4%
	Todas as anteriores	4	16%
Mitoses	Ausente	24	96%
	Presente	1	4%
Tipo Celular	Epitelióide	1	4%
	Fusiforme	4	16%
	Ambos	20	80%
Nucleares			
Atipia	Discreta	12	48%
	Moderada	11	44%
	Intensa	2	8%
Formato	Arredondado	3	12%
	Alongado	3	12%
	Ambos	19	76%
Cromatina	Dispersa	15	60%
	Grumosa	8	32%
	Ambos	2	8%
Nucleolares			
Proeminência	Proeminente	3	12%
	Não proeminente	22	88%
Pigmentares			
Intensidade	Baixa	2	8%
	Moderada	6	24%
	Alta	17	68%
Macrófagos			
Celularidade	Baixa	5	20%
	Moderada	4	16%
	Alta	16	64%
Localização	Ao redor de ninhos	1	4%
	Difusa	24	96%
Invasão			
Sanguínea	Presente	1	4%
	Ausente	24	96%
Necrose	Ausente	16	64%
	≤ 50%	9	36%

5.3 CLASSIFICAÇÃO DAS LESÕES MELANOCÍTICAS

Seguindo a classificação histológica feita por Valentine (1995), as amostras conseguidas para este estudo se enquadraram na classificação como melanoma ou melanocitoma dérmicos, uma vez que para diferenciar as duas categorias temos que identificar o número de tumores por animal, informação não presente na descrição dos animais.

5.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA POR IMUNOISTOQUÍMICA

A expressão das proteínas foi dividida em anticorpos para melanócitos, anticorpos de proliferação celular e a proteína p53, como a seguir:

Anticorpos para melanócitos

A análise da expressão de S100 foi feita em 24 dos 25 casos devido à perda dos cilindros referentes ao caso. Ela indicou que houve 28,0% de casos negativos, 24,0% de casos com expressão fraca para o anticorpo e 44,0% de casos com expressão moderada a forte. As figuras 4, 5 e 6 ilustram a expressão negativa, fraca e moderada/forte do anticorpo S100 nos casos apresentados (aumento de 40x em microscópio óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos, que não tem expressão da proteína S100. Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração em vermelho.

Figura 4 - Expressão negativa de S100

Figura 5 – Expressão fraca de S100

Figura 6 – Expressão moderada/forte de S100

Quanto ao HMB-45, todos os casos foram analisados, e houve 16,0% de casos negativos, 56,0% de casos com expressão fraca para a proteína e 28,0% de casos com expressão moderada a forte. As figuras 7, 8 e 9 ilustram a expressão negativa, fraca e moderada/forte do anticorpo HMB-45 nos casos apresentados (aumento de 40x em microscópio óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos, que não tem expressão da proteína HMB-45. Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração em vermelho.

Figura 7 – Expressão negativa de HMB-45

Figura 8 – Expressão fraca de HMB-45

Figura 9 – Expressão moderada/forte de HMB-45

A expressão de Melan-A indicou que houve 64,0% de casos negativos, 28,0% de casos com expressão fraca para a proteína e 8,0% de casos com expressão moderada a forte, em todos os casos. As figuras 10, 11 e 12 ilustram a expressão negativa, positiva e moderada/forte para a proteína Melan-A nos casos apresentados (aumento de 40x em microscópio óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos, que não tem expressão da proteína Melan-A. Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração em vermelho.

Figura 10 – Expressão negativa de Melan-A

Figura 11 - Expressão fraca de Melan-A

Figura 12 – Expressão moderada/forte de Melan-A

Quando avaliados os três anticorpos quanto ao número de casos positivos, agrupando os escore de 1 a 9, observou-se que 17 casos (68%) eram positivos para S100, 21 casos (84%) eram positivos para HMB-45 e 9 casos (36%) eram positivos para Melan-A. Em 4 casos, nenhum dos marcadores foi expresso (16%), em 3 casos houve positividade de apenas 1 anticorpo (12%), em 10 casos houve positividade para dois anticorpos (40%) e em 8 casos houve positividade para os três anticorpos (32%).

Anticorpos de proliferação

A análise da expressão de Ki-67, em 24 dos 25 casos, indicou que a porcentagem de células marcadas variou de 0,0% a 0,3%, sendo a média 0,0005%. O número de células contadas por caso variou de 187 a 2445. As figuras 13 e 14 ilustram a expressão negativa e positiva para Ki-67 (aumento de 40x em microscópio

óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos, Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração também marrom, porém nuclear (seta).

Figura 13 – Expressão negativa de Ki-67

Figura 14 – Expressão positiva para Ki-67

Quanto ao PCNA, todos os casos puderam ser analisados, e a expressão nuclear variou de 0,0% a 52,6%, com média de 15,7%. O número de células contadas por caso variou de 128 a 3068. As figuras 15 e 16 ilustram a expressão negativa e positiva para PCNA nas células tumorais (aumento de 40x em microscópio óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos, Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração em vermelho.

Figura 15 – Expressão negativa de PCNA

Figura 16 – Expressão positiva para PCNA

A proteína p53

A análise da expressão de p53 em todos os casos indicou a porcentagem de células marcadas variou de 0,0% a 30,1%, com média de 6,1%. O número de células contadas por caso variou de 75 a 2413. As figuras 17 e 18 ilustram a expressão negativa e positiva para p53 nas células tumorais (aumento de 40x em microscópio óptico). As células maiores com pigmentação marrom são os melanófagos. Há também células melanocíticas com pigmento marrom em seus citoplasmas. A expressão da proteína em questão apresenta coloração também marrom, porém nuclear (seta).

Figura 17 – Expressão negativa de p53

Figura 18 – Expressão positiva de p53

5.5 ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS MARCADORES BIOLÓGICOS E VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS

A expressão das proteínas foi dividida em anticorpos para melanócitos, anticorpos de proliferação celular e a proteína p53, como a seguir:

Anticorpos de melanócitos

Houve apenas uma associação estatisticamente positiva entre as variáveis morfológicas tumorais e os anticorpos de melanócitos estudados. Neoplasias cuja celularidade de macrófagos era baixa apresentaram marcação mais forte para S100 ($p=0,0492$). Nenhuma outra associação estatisticamente positiva foi observada em entre os anticorpos e as variáveis morfológicas (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a mediana do escore de marcação dos anticorpos para melanócitos com as características morfológicas tumorais

Características Tumorais	Categorias	S100	HMB-45	Melan-A	N
Celulares					
Celularidade	Baixa	6,00	6,50	2,00	2
	Moderada/Alta	2,80	1,90	0,10	23
Distribuição	Difusa	1,10	1,00	0,00	3
	Difusa com feixes	3,20	2,00	0,10	13
	Em feixes	3,30	1,80	0,30	4
	Em ninhos	0,00	0,00	0,00	1
	Todas as anteriores	2,90	2,20	0,60	4
Mitoses	Ausente	2,80	1,95	0,10	24
	Presente	2,80	2,30	0,50	1
Tipo Celular	Epitelióide	0,00	0,00	0,00	1
	Fusiforme	3,00	1,85	0,90	4
	Ambos	2,25	2,00	0,10	20
Nucleares					
Atipia	Discreta	2,80	2,00	0,15	12
	Moderada/Intensa	1,70	1,90	0,10	13
Formato	Arredondado	0,00	0,00	0,00	3
	Alongado	3,00	1,80	0,10	3
	Ambos	2,80	2,30	0,30	19
Cromatina	Dispersa	2,80	1,90	0,10	15
	Grumosa	2,40	1,95	0,20	8
	Ambos	3,20	3,10	1,35	2
Nucleolares					
Proeminência	Proeminente	1,00	1,00	0,00	3
	Não proeminente	3,00	2,00	0,10	22
Pigmentares					
Intensidade	Baixa	3,30	2,15	0,30	2
	Moderada/Alta	2,25	1,90	0,10	23
Macrófagos					
Celularidade	Baixa	3,80	}	0,50	5
	Moderada/Alta	1,70		0,10	20
Localização	Ao redor de ninhos	0,00	9,00	0,00	1
	Difusa	2,80	2,00	0,10	24
Invasão					
Sanguínea	Presente	3,00	1,90	0,00	1
	Ausente	2,80	2,00	0,10	24
Necrose	Ausente	3,00	2,00	0,20	16
	≤ 50%	1,70	1,80	0,10	9

Legenda 1 - * p <0,05

Anticorpos de proliferação celular

Não houve nenhuma associação estatisticamente positiva entre as características morfológicas e os marcadores Ki-67 e PCNA (Tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a média e desvio padrão da marcação dos anticorpos de proliferação celular com as características morfológicas tumorais

Características Tumorais	Categorias	Ki-67	PCNA	N
Celulares				
Celularidade	Baixa	0	1,29±0,38	2
	Moderada/Alta	0,06±0,10	17,63±16,80	23
Distribuição	Difusa	0,10±0,18	25,76±8,87	3
	Difusa com feixes	0,03±0,06	9,99±16,45	13
	Em feixes	0	14,89±14,31	4
	Em ninhos	0,09	11,74	1
	Todas as anteriores	0,14±0,12	32,42±16,56	4
Mitoses	Ausente	0,06±0,10	16,08±17,02	24
	Presente	0	22,07	1
Tipo Celular	Epitelióide	0	30	1
	Fusiforme	0,03±0,06	16,61±20,36	4
	Ambos	0,06±0,10	15,58±16,63	20
Nucleares				
Atipia	Discreta	0,02±0,05	14,38±15,81	12
	Moderada/Intensa	0,09±0,12	17,07±18,02	13
Formato	Arredondado	0,03±0,05	24,39±10,98	3
	Alongado	0,04±0,07	21,63±21,69	3
	Ambos	0,06±0,10	14,21±16,92	19
Cromatina	Dispersa	0,02±0,04	16,37±16,30	15
	Grumosa	0,10±0,11	13,55±14,04	8
	Ambos	0,15±0,21	27,02±36,19	2
Nucleolares				
Proeminência	Proeminente	0,08±0,07	16,34±19,06	3
	Não proeminente	0,05±0,10	16,32±16,86	22
Pigmentares				
Intensidade	Baixa	0	11,44±15,03	2
	Moderada/Alta	0,06±0,10	16,75±17,08	23
Macrófagos				
Celularidade	Baixa	0,07±0,09	21,17±16,85	5
	Moderada/Alta	0,05±0,10	15,11±16,88	20
Localização	Ao redor de ninhos	0,09	11,74	1
	Difusa	0,05±0,10	16,51±17,04	24
Invasão				
Sanguínea	Presente	0	13,95	1
	Ausente	0,06±0,10	16,43±17,06	24
Necrose	Ausente	0,04±0,09	14,26±16,25	16
	≤ 50%	0,09±0,10	20,00±17,84	9

A proteína p53

Houve associação estatisticamente positiva entre a celularidade dos macrófagos ($p=0,0207$) e o p53 (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos 25 casos analisados relacionando a média e desvio padrão da marcação por p53 com as características morfológicas tumorais

Características Tumorais	Categorias	P53	N
Celulares			
Celularidade	Baixa	0	2
	Moderada/Alta	$6,88 \pm 8,76$	23
Distribuição	Difusa	$2,66 \pm 2,83$	3
	Difusa com feixes	$6,40 \pm 10,15$	13
	Em feixes	$4,89 \pm 6,01$	4
	Em ninhos	0	1
	Todas as anteriores	$11,77 \pm 8,30$	4
Mitoses	Ausente	$6,05 \pm 8,68$	24
	Presente	12,53	1
Tipo Celular	Epitelióide	0	1
	Fusiforme	$5,61 \pm 7,39$	4
	Ambos	$6,77 \pm 9,07$	20
Nucleares			
Atipia	Discreta	$5,45 \pm 8,24$	12
	Moderada/Intensa	$7,10 \pm 9,18$	13
Formato	Arredondado	$0,05 \pm 0,09$	3
	Alongado	$7,48 \pm 7,81$	3
	Ambos	$7,11 \pm 9,18$	19
Cromatina	Dispersa	$5,09 \pm 7,41$	15
	Grumosa	$7,99 \pm 10,65$	8
	Ambos	$8,77 \pm 12,41$	2
Nucleolares			
Proeminência	Proeminente	$5,92 \pm 10,17$	3
	Não proeminente	$6,36 \pm 8,64$	22
Pigmentares			
Intensidade	Baixa	$18,09 \pm 7,88$	2
	Moderada/Alta	$5,29 \pm 8,01$	23
Macrófagos			
Celularidade	Baixa	$15,70 \pm 11,52$	* 5
	Moderada/Alta	$3,96 \pm 6,03$	
Localização	Ao redor de ninhos	0	1
	Difusa	$6,57 \pm 8,68$	24
Invasão			
Sanguínea	Presente	0	1
	Ausente	$6,57 \pm 8,68$	24
Necrose	Ausente	$5,96 \pm 9,68$	16
	$\leq 50\%$	$6,93 \pm 6,74$	9

Legenda 2 - * $p < 0,05$

6. DISCUSSÃO

Há poucos estudos envolvendo o comportamento das neoplasias melanocíticas em equinos, principalmente estudos de marcação imunoistoquímica. Este trabalho teve como objetivo estudar estas lesões quanto a aspectos anatomopatológicos e de expressão das proteínas S100, HMB-45, Melan-A, Ki-67, PCNA e p53 utilizadas para o diagnóstico e como fator de prognóstico do melanoma humano.

As lesões melanocíticas em equinos acometem machos e fêmeas de maneira indistinta, havendo relatos de maior predileção de acometimento em machos (SUNDBERG et al., 1977; PASCOE; SUMMERS, 1981; FLEURY et al., 2000b; SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009), fêmeas (FOLEY; VALENTINE; KINCAID, 1991), e relatos sem qualquer predileção por sexo (PASCOE; SUMMERS, 1981; VALENTINE, 1995). Quanto à idade, animais com mais de 15 anos são os mais susceptíveis a desenvolver a doença (SUNDBERG, et al., 1977; PASCOE; SUMMERS, 1981; FLEURY et al., 2000b), chegando a haver relatos em que mais de 75% dos animais, com mais de 15 anos, apresentaram neoplasias melanocíticas (MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002). A frequência de lesões melanocíticas em cavalos de pelagem tordilha é maior (MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002; SUNDBERG et al., 1977; PASCOE; SUMMERS, 1981; FOLEY; VALENTINE; KINCAID, 1991; VALENTINE, 1995; MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002; SELTENHAMMER et al., 2003) e, acredita-se que esta possa alcançar 80% do total de casos, se os animais atingirem idade superior a 15 anos (VALENTINE, 1995; FLEURY et al., 2000b; ROELS, 2000; FINTL; DIXON, 2001; SELTENHAMMER et al., 2003; SELTENHAMMER et al., 2004).

As regiões mais propícias ao desenvolvimento de neoplasias melanocíticas em equinos são a base da cauda e a região perianal (MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002; SUNDBERG, J. et al., 1977; PASCOE; SUMMERS, 1981; FLEURY et al., 2000b; MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002; SELTENHAMMER et al., 2003), havendo também relatos de maior predileção por membros e tronco (FOLEY; VALENTINE; KINCAID, 1991). Outros locais como lábios, pálpebras, região genital e glândula parótida também podem apresentar tumores (FLEURY et al., 2000a; FINTL; DIXON, 2001). Em cavalos tordilhos, devido

à despigmentação inicial dos pelos ocorrer ao redor dos olhos e na região anal, há alta incidência nestas regiões (SELTENHAMMER et al., 2003).

A população deste estudo apresentou maior número de machos que fêmeas, sendo todos tordilhos, porém, em sua maioria com idade inferior a 15 anos (60%), contrariando os dados presentes na literatura. Houve maior presença de animais SRD no estudo. A presença de animais da raça Lusitana, Árabe e Sueca com neoplasias melanocíticas é devido a estas apresentarem em sua maioria, ou totalidade, animais tordilhos como padrão de pelagem de raça (FLEURY et al., 2000a,b; SMITH; GOLDSCHMITH; MCMANUS, 2002; SELTENHAMMER et al., 2003). A localização dos casos apresentados está de acordo com a encontrada na literatura, havendo maior número em região perianal e base da cauda.

Morfológicamente, pudemos constatar que as células tumorais em sua maioria apresentaram celularidade de moderada a alta, com distribuição difusa e em feixes e predomínio de células mistas (fusiformes e epitelióides em uma mesma lesão) em derme. O núcleo destas células era predominantemente de células com atipia discreta a moderada, de formato tanto arredondado como alongado em uma mesma lesão, cromatina dispersa e nucléolo não proeminente. A pigmentação celular era intensa e havia grande quantidade de macrófagos (melanófagos) de distribuição difusa. Quanto aos critérios de malignidade estipulados nesta análise morfológica, os casos apresentados consistiam provavelmente de neoplasias benignas, uma vez que não foi encontrada invasão perineural ou linfática, havendo apenas um caso com invasão sanguínea, e um caso com uma figura de mitose, além das características de atipia celular discretas.

A observação de células tanto epitelióides como fusiformes em um mesmo tumor contrasta com o relato feito por MacGillivray et al.(2002), que realizaram um estudo comparativo de melanomas dérmicos e metastáticos, onde havia células neoplásicas preferencialmente epitelióides com núcleo grande, ovóide ou redondo, de nucléolo proeminente. A semelhança encontrada consistiu na grande quantidade de melanófagos pigmentados e no baixo número de figuras de mitose (MACGILLIVRAY; SWEENEY; DEL PIERO, 2002).

Segundo o trabalho de Roels et al. (2000) as amostras teciduais deste estudo estão enquadradas no grupo dos melanomas benignos, apesar de haver predomínio de células epitelióides, e presença de linfócitos, características não encontradas no presente estudo (ROELS et al., 2000).

Utilizando como base a classificação de Valentine (1995b), os casos encontrados neste estudo se enquadram como melanomas dérmicos ou melanomatoses dérmica. As duas categorias apresentam as mesmas características histológicas, com tumores em derme profunda, presença de células tumorais pequenas, solitárias, homogêneas, indistintas, epitelióides ou dendríticas, de cromatina condensada e densa pigmentação citoplasmática, sem nenhuma figura de mitose aparente. A diferenciação de melanomas e melanocitomas dérmicos dá-se através do número de lesões, que na primeira é de uma a duas lesões, e na última três ou mais lesões. Por falta de informações a respeito dos animais, no presente estudo, não foi possível identificar o número de lesões, justificando a classificação indefinida entre as duas lesões.

De acordo com o estudo feito por Seltenhammer et al. (2004), as lesões melanocíticas apresentadas neste trabalho assemelharam-se as do melanoma benigno de cavalos tordilhos, com áreas de intensa pigmentação melanocítica intradérmica e subcutânea, limites bem definidos, comumente observadas na proximidade de glândulas sudoríparas apócrinas e outros anexos, sem comprometimento de junção dermoepidérmica. O tipo celular predominante era de células mistas com grandes células epitelióides contendo núcleo esferóide, além de células fusiformes e balonizadas contendo também núcleos grandes e esferóides. Apresentava grânulos de melanina grosseiros e atipia nuclear. Havia melanófagos, com grânulos de melanina bastante pigmentados, associados a apoptose no centro de tumores pigmentados e poucas figuras de mitose. As lesões melanocíticas eram enegrecidas, homogêneas e, na maioria dos casos, envolvidas por uma pseudo-cápsula fibrosa. Diferente dos melanomas benignos de cavalos tordilhos as margens das lesões, neste estudo, não apresentaram maior índice proliferativo.

Seguindo o trabalho descrito por Schoniger e Summers (2009), as neoplasias em questão seriam classificadas, segundo a classificação humana, em nevos azuis celulares, por sua alta celularidade, diversidade de tipos celulares em um mesmo tumor, e presença de mais de um nucléolo por núcleo. A única característica não encontrada nos tumores em questão foi o número inferior de figuras de mitose.

Através dos trabalhos descritos acima pode-se constatar que, as neoplasias melanocíticas apresentam uma classificação confusa, por isso, considerou-se como padrão a classificação a de Valentine (1995), que parece apresentar a nomenclatura mais adequada.

Para que haja a comparação com neoplasias melanocíticas humanas há a necessidade de estudos posteriores com um número maior de amostras, uma vez que a classificação humana é muito diversificada e o número de amostras analisadas histologicamente nos trabalhos científicos com equinos é reduzido.

Técnica de Imunoistoquímica

Dentre as dificuldades encontradas na leitura das lâminas, destaca-se a grande quantidade de células carregadas de pigmento melânico e macrófagos pigmentados em marrom, o que poderia alterar a interpretação na análise imunoistoquímica. No entanto, a utilização de uma lâmina de controle negativo apenas incubada com BSA permitiu evidenciar claramente mudanças de intensidade na coloração imunoistoquímica. A utilização de cromógeno vermelho ao invés do marrom também facilitou a visualização.

Em nosso estudo utilizamos, para quatro anticorpos, três citoplasmáticos (S100, Melan-A e HMB-45) e um anticorpo de proliferação celular (PCNA) a técnica que lança mão da fosfatase alcalina e *Permanent Red* como cromógeno (ENVISION® Dako), revelando uma marcação de coloração avermelhada, o que facilitou a visualização da marcação positiva para os anticorpos em questão. A padronização dos anticorpos monoclonais HMB-45 e Melan-A apresentou desafios por serem anticorpos específicos para melanócitos de humanos, justificando a concentração tão alta dos dois (1:10) para obtenção de resultados satisfatórios.

Os outros dois anticorpos (S100 e PCNA), apesar de serem monoclonais identificam antígenos com maior homologia entre espécies, facilitando a padronização resultando em diluições e procedimentos compatíveis com os citados por seus fabricantes.

A técnica de peroxidase com cromógeno DAB (ADVANCE® Dako) foi usada para a visualização de dois anticorpos (Ki-67 e p53), devido a dificuldade na padronização com a outra técnica. Além do kit ENVISION® ser menos sensível que o ADVANCE® não foi conseguida marcação dos controles positivos mesmo em diluições reduzidas, optando-se por um método mais sensível.

O Microarranjo de Tecidos

A técnica de microarranjo de tecidos trouxe vantagens ao presente trabalho por permitir a análise simultânea dos casos em questão, em uma única lâmina. Foram necessárias, após padronização dos anticorpos, apenas uma lâmina por anticorpo e duas lâminas de controle negativo (uma para cada técnica), uma vez que os controles positivos estavam inseridos no TMA, totalizando oito lâminas. Se fosse realizado o método convencional, com uma lâmina por caso, seriam necessárias 162 lâminas (25 lâminas por anticorpo, uma lâmina de controle positivo e outra de negativo). Portanto, podemos constatar que houve diminuição na quantidade de material utilizado, diminuição do tempo de realização da experimentação e análise das lâminas.

Além disso, esta técnica permite uniformidade experimental, pois cada amostra de tecido é tratada de maneira idêntica, sendo a padronização igual para todos os tecidos. Os blocos originais podem ser armazenados e usados para posteriores estudos, pois a retirada de pequenos fragmentos não comprometeu sua integridade.

A principal desvantagem quanto ao uso do TMA consiste na sua representatividade para tumores heterogêneos. Porém, um estudo demonstrou que através da comparação qualitativa dos resultados de blocos inteiros de tecido com os TMAs há concordância em 96% dos casos (HSU et al., 2002). Outro estudo demonstrou que a análise imunoistoquímica de duas amostras teciduais de um mesmo bloco doador é comparável à análise de secções de todo o tecido em mais de 95% dos casos (CAMP; CHARETTE; RIMM, 2000). Estes achados demonstram que a heterogeneidade intratumoral não é um impedimento principal no uso de TMA (KALLIONIEMI et al., 2001; JAWHAR, 2009).

Anticorpos de melanócitos

Na comparação dos escores estabelecidos para identificação da marcação dos anticorpos para melanócitos e as características morfológicas, não houve

diferenças significativas, justificando a grande variedade de características morfológicas encontradas nas neoplasias melanocíticas, como o tipo celular, o que torna difícil a identificação de características padrões destas. Outro fator que pode ser levado em consideração é o número reduzido de casos, que apesar da amostragem permitir a análise estatística, sabe-se que esta tem menor confiabilidade do que se houvesse uma amostragem maior.

A única diferença significativa obtida foi em relação à marcação pelo anticorpo Anti-S100 e a celularidade de macrófagos (melanófagos), havendo maior intensidade de marcação em tumores com baixa celularidade (menor número) de macrófagos. Entretanto, esta constatação pode ser equivocada, uma vez que, a menor celularidade de melanófagos implica, teoricamente, no maior número de células neoplásicas que podem ser marcadas pelo anticorpo Anti-S100 ou que a sua ausência facilitaria a visualização de melanócitos marcados.

Estudos de positividade da proteína S100 em neoplasias melanocíticas de equinos é de 100%, tanto em tumores benignos (ROELS et al., 2000; SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009) como malignos (ROELS et al., 2000; SELTENHAMMER et al., 2004)). Em cães, esta positividade é relatada como sendo 75% (KOENIG et al., 2001), 76% (SANDUSKY; CARLTON; WIGHTMAN, 1985; 1987; RABANAL et al., 1989) ou 90% (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999; SÁNCHEZ et al., 2007). Em humanos, a marcação esperada para a proteína S100 policlonal também está próxima de 100% em todos os tipos de neoplasias melanocíticas (BLESSING, SANDERS, GRANT, 1998; ALONSO et al., 2004; ZEMBOWICZ; MIHM, 2004; JAKOBIEC; BHAT; COLBY, 2010; NAZARIAN et al., 2010), sendo considerado um marcador sensível e porém pouco específico para a diferenciação das neoplasias melanocíticas de epiteliais (HSU et al., 2002). Um estudo ainda constatou que o tempo de sobrevida de pacientes com melanoma é inversamente relacionado à intensidade de marcação do S100 em melanomas malignos da pele da face e cavidade oral de humanos (KORABIOWSKA et al., 1994).

Os resultados apresentados neste estudo mostraram uma porcentagem aquém das citadas acima (68%), se aproximando dos relatados em cães.

A sobrevida dos animais em questão não foi analisada, uma vez que não houve acompanhamento dos casos após a retirada da biópsia.

Não encontramos estudos com expressão positiva da proteína Melan-A em equinos, sendo este trabalho inédito na área. Os resultados de expressão nesta

espécie foram abaixo (36%) dos encontrados em trabalhos com cães e humanos. Em cães, a positividade para Melan-A é de 90% (KOENIG et al., 2001; SÁNCHEZ et al., 2007) e 91,5% das neoplasias melanocíticas, tanto orais como cutâneas, não havendo expressão da proteína em melanófagos (RAMOS-VARA et al., 2000), o que justificaria também a não marcação em melanófagos no presente trabalho, auxiliando na identificação das células tumorais. Na avaliação concomitante de S100 e Melan-A realizada por dois grupos de pesquisadores (RAMOS-VARA et al., 2000; KOENIG et al., 2001), um deles observou marcação positiva para ambos os anticorpos em 71,3% dos melanomas orais caninos, marcação positiva para S100 e negativa para Melan-A em 54,5% dos casos, marcação negativa para S100 e positiva para Melan-A em 20% dos casos e negativa para ambos os anticorpos em 3,8% dos casos (RAMOS-VARA et al. 2000). Outro estudo, que utilizou a proteína S100a, anticorpo monoclonal específico para a subunidade a de S100, apresentou marcação positiva para ambos (S100a e Melan-A) em 45% dos casos, marcação positiva para S100a e negativa para Melan-A em 34% dos casos, marcação negativa para S100a e positiva para Melan-A em 17% dos casos e negativa para ambos os anticorpos em 3% dos casos (KOENIG et al., 2001).

A mesma análise com S100 e Melan-A foi feita no presente estudo e encontramos positividade concomitante de S100 e Melan-A em 32% dos casos, apenas S100 positivo em 36% dos casos, apenas Melan-A positivo em 4% dos casos e negativo para ambos os anticorpos em 28% dos casos obtidos no estudo. Como a marcação individual dos anticorpos teve resultados diferentes, só houve semelhança na positividade de S100 e negatividade de Melan-A. Este resultado permite supor que o painel de imunoistoquímica com os dois anticorpos não seja suficiente para o diagnóstico de neoplasias melanocíticas em equinos.

Em humanos, a marcação para Melan-A em neoplasias melanocíticas foi bastante estudada, sendo encontradas, inclusive, diferenças na intensidade de marcação em células epitelióides e fusiformes com maior intensidade de pigmentação nas primeiras (BUSAM et al., 1998; JUNGBLUTH et al., 1998). Há diferença de positividade para lesões melanocíticas benignas, melanomas cutâneos primários e melanomas metastáticos. Em lesões melanocíticas benignas a positividade é de 74% a 100% dos casos (ZEMBOWICZ; MIHM, 2004; JAKOBIEC; BHAT; COLBY, 2010; NAZARIAN et al., 2010), em melanomas malignos primários de 85% a 100% dos casos (BUSAM et al., 1998; ALONSO et al., 2004; NAZARIAN

et al., 2010) e em melanomas metastáticos de 75% a 84% dos casos (ALONSO et al., 2004; NAZARIAN et al., 2010).

Não houve diferenciação na intensidade de marcação quanto ao tipo celular no presente trabalho, e as neoplasias melanocíticas presentes apresentavam características de lesões melanocíticas benignas, apesar de a expressão de Melan-A ser abaixo do esperado (36%). Esta expressão diminuída pode ser pela heterogeneidade de marcação, também relatada em outros estudos (SUNDRAM et al., 2003).

Quanto ao anticorpo HMB-45, foram realizados dois estudos em equinos, um deles não apresentou positividade em lesões semelhantes a nevos melanocíticos (SCHÖNIGER; SUMMERS, 2009), resultado também encontrado em nevos melanocíticos humanos (BUSAM, 2005). O outro estudo apresentou positividade para melanomas benignos de cavalos tordilhos e nevos azuis em humanos, com níveis de expressão significativamente maiores nos tumores malignos de cavalos tordilhos e não tordilhos, assim como nos casos malignos em humanos (SELTENHAMMER et al., 2004). Em cães, apenas um estudo foi relatado utilizando HMB-45 como marcador de lesões melanocíticas, não havendo marcação nas 13 neoplasias estudadas, o que classificou o anticorpo como não adequado para a identificação de neoplasias melanocíticas nestes animais (BERRINGTON; JIMBOW; HAINES, 1994). Em humanos, a marcação em lesões melanocíticas benignas encontrada é de 18% (NAZARIAN et al., 2010) e 100% (JAKOBIEC; BHAT; COLBY, 2010), em melanomas malignos primários há marcação de HMB-45 de 72% (NAZARIAN et al., 2010) e 92, 4% dos casos (ALONSO et al., 2004) e, em melanomas metastáticos a marcação positiva varia de 75% (NAZARIAN et al., 2010) a 81% dos casos (ALONSO, S. et al., 2004). Segundo Busam et al. (1998) o anticorpo Melan-A marca mais nevos e melanócitos por nevo do que o HMB-45, e o Melan-A é mais específico que S100 (BUSAM et al., 1998).

É interessante notar que não há um marcador de melanócitos que seja 100% positivo ou negativo para neoplasias melanocíticas, por isso faz-se necessária a utilização de um painel de anticorpos para imunoistoquímica para a avaliação destas lesões em caso de dúvidas quanto ao diagnóstico (NAZARIAN et al., 2010). Como constatado anteriormente, a utilização de apenas S100 e Melan-A não parecem ser suficientes para a identificação de neoplasias melanocíticas em equinos, sendo aproximadamente 30% dos casos do presente estudo negativos tanto para S100

como Melan-A. Assim, a utilização de um terceiro anticorpo pode ser útil. Portanto, os três anticorpos utilizados para a identificação de melanócitos em nosso estudo foram comparados de maneira concomitante, a fim de chegarmos a um provável painel de anticorpos na identificação de lesões melanocíticas em equinas.

Dos resultados obtidos pudemos constatar que, se utilizados os três anticorpos, mais de 70% das neoplasias melanocíticas irão ser positivas para pelo menos dois dos três anticorpos, facilitando a identificação destas lesões. Entretanto, considerando que se trata de lesões com grande quantidade de pigmento melânico, seu uso seria restrito aos raros casos em que a pigmentação não está presente.

Anticorpos de proliferação celular

O aumento da atividade proliferativa de células tumorais também está associado à malignidade e é um fator de prognóstico importante em diversas neoplasias humanas. Os marcadores de proliferação celular mais usados em humanos são o PCNA e Ki-67 (LINDEN et al., 1992).

A análise estatística feita relacionando os anticorpos de proliferação celular Ki-67 e PCNA, em nosso estudo, não apresentou diferença significativa, o que indica não haver relação entre a marcação dos anticorpos e as características morfológicas das neoplasias melanocíticas. Confirmando a grande variedade de tipos e formatos celulares no mesmo tumor, o que dificulta a classificação exata.

Quanto ao índice de proliferação celular mensurado pela porcentagem de células positivas para o anticorpo contra Ki-67 variou de 0,0% a 0,3%, sendo a média 0,0005% no presente estudo. Roels et al. (2000) analisaram seis neoplasias melanocíticas de cinco equinos, de duas metastáticas e quatro benignas. Dentre elas o índice de proliferação Ki-67 teve valores que variaram de 0,55% em neoplasias benignas, a 5,4% em neoplasias malignas, porém, sem diferença significativa entre as neoplasias benignas e malignas (ROELS et al., 2000). No estudo comparativo de Seltenhammer et al. (2004), estes encontraram positividade de 45 a 100% dos núcleos de células neoplásicas em humanos, melanomas de equinos não tordilhos e melanomas malignos de cavalos tordilhos, sendo o nevo azul humano e o melanoma benigno de cavalos tordilhos de marcação semelhante.

Em cães, Roels et al. (1999), constataram que o ki-67 pode ser usado como fator de prognóstico e sobrevida para melanomas, sendo correlacionado com o diagnóstico histológico e crescimento invasivo. O índice de proliferação deste anticorpo variou de 0,25%, em um tumor benigno situado na pele do metacarpo, a 21% em um melanoma metastático amelanótico na pele do carpo (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Em outro estudo feito em cães, os melanocitomas (também denominados melanomas benignos) tiveram média de marcação positiva para Ki-67 de quatro vezes menor que os melanomas malignos, havendo forte correlação de positividade entre os índices de proliferação de Ki-67 e o índice mitótico, mesmo se as diferenças no índice mitótico de melanocitomas e melanomas malignos fossem estatisticamente menores que os obtidos com o índice de proliferação de Ki-67 (MILLANTA et al., 2002). Este índice foi estatisticamente menor em tumores benignos que em tumores malignos de células fusiformes, epitelióides e mistas, respectivamente. Não houve diferença estatística entre melanocitomas e melanomas malignos dendríticos. O índice proliferativo foi estatisticamente maior em melanomas malignos orais que em cutâneos. Altos índices de proliferação mostraram associação limítrofe com a invasão de vasos linfáticos, enquanto não foi encontrada correlação com a espessura tumoral, invasão do estroma, grau de atipia ou presença de infiltrado inflamatório ou necrose (MILLANTA et al., 2002).

Em humanos, lesões melanocíticas benignas apresentam marcação positiva para Ki-67 em zona superficial, além de menor índice de proliferação que as lesões melanocíticas malignas (ALONSO et al., 2004; ILMONEN et al., 2005; NASR; EL-ZAMMAR, 2008; CARLSON; ROSS; SLOMINSKI, 2009; JAKOBIEC; BHAT; COLBY, 2010; LADSTEIN et al., 2010; SVIATOK et al., 2010), apresentando atividade mitótica independente da reduzida marcação com o anticorpo (CARLSON; ROSS; SLOMINSKI, 2009). A média de proliferação para Ki-67 encontrada na literatura é de 1,89% para lesões melanocíticas benignas e 17,3% para melanomas. (JAKOBIEC; BHAT; COLBY, 2010). Não foi observado valor prognóstico na análise de sobrevida para melanomas primários. Em melanomas metastáticos, o nível de expressão de ki-67 é heterogêneo, não refletindo tendência consistente durante a progressão da doença, sem valor prognóstico (ILMONEN et al., 2005). Mitoses foram incluídas no estadiamento humano (BALCH et al., 2009), sendo melanomas miogênicos piores em sobrevida que os não miogênicos.

Observando os estudos anteriores tanto em equinos, caninos ou humanos, e correlacionando com os resultados apresentados neste estudo, podemos constatar que o baixo índice proliferativo de Ki-67 pode estar relacionado à benignidade das lesões apresentadas, o que corrobora com as características morfológicas no estudo.

O índice proliferativo de PCNA no presente estudo teve porcentagem de células positivas variando de 0,0% a 52,6%, com média de 15,70%. Roels et al. (2000) identificaram em equinos índices de 10 a 43% de positividade, revelando valores mais baixos para neoplasias melanocíticas benignas, e mais altos para malignas (ROELS et al., 2000). O estudo indicou que os marcadores de proliferação não discriminam tumores benignos de malignos, diferente do encontrado em humanos, cães e gatos (RIEGER et al., 1993; KARLSSON et al., 1996; ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999), isto ocorre principalmente porque os tumores benignos parecem ter proliferação mais exacerbada nesta espécie. Seltenhammer et al. (2004) também utilizaram o PCNA como marcador de proliferação celular, e encontraram variação de positividade de 45 a 100%. Em cães, o anticorpo PCNA apresenta, significativamente, maior intensidade de marcação que Ki-67, variando de 2,8% ($\pm 0,18\%$) para um tumor cutâneo benigno, a 54% ($\pm 1,1\%$) para o mesmo caso de melanoma metastático amelanótico na pele do carpo (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Como observado no presente trabalho, não houve correlação entre o índice de proliferação (PCNA) e o tipo celular predominante, tamanho do tumor ou crescimento invasivo (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999).

Em humanos, apesar de dados desta proteína em melanoma não terem sido consistentes em mostrar o aumento da expressão durante a progressão tumoral, a maioria das informações publicadas sugerem existir relação com a progressão (RIEGER et al., 1993; LOGGINI et al., 2001). No trabalho de Guerriere-Kovach et al. (2004), a média de positividade para PCNA em melanomas metastáticos foi de 89% comparado com 50% em melanomas primários (GUERRIERE-KOVACH et al., 2004).

De acordo com os dados encontrados no presente trabalho, houve maior marcação de PCNA em relação ao Ki-67, também relatado na literatura. Os dois anticorpos de proliferação podem ser usados para auxílio diagnóstico nas neoplasias melanocíticas de equinos.

A proteína p53

A proteína p53 normalmente está presente em pequenas quantidades nos tecidos normais, não detectáveis através de imunoistoquímica (HUSSEIN; HAEMEL; WOOD, 2003). A análise da expressão de p53, no presente estudo, indicou a variação de 0,0% a 30,1% de células positivas, com média de 6,1%. O único estudo encontrado utilizando p53 em neoplasias melanocíticas de equinos mostrou hiperexpressão desta proteína em neoplasias melanocíticas malignas de 2,1% a 5,4% de células positivas, e redução ou ausência de expressão nas benignas (0,55% a 2,3% de positividade). Como conclusão o grupo constatou que tumores melanocíticos em cavalos apresentam características fenotípicas diferentes dos cães, gatos e humanos (ROELS et al., 2000). Em cães, a proteína p53 não foi detectada em células de lesões pigmentadas de cães com neoplasias melanocíticas, mas ela estava presente em células normais (RITT; WOJCIESZYN; MODIANO, 1998).

Em humanos, sabe-se que o melanoma é uma das neoplasias onde o p53 ainda é selvagem, e aumenta tanto na intensidade de marcação como no número de células positivas com a progressão tumoral (ALBINO et al., 1994; POREMBA et al., 1995; SPARROW et al., 1995b; ESSNER et al., 1998). Esta expressão de p53 varia de 0 a 60% com a progressão tumoral (HUSSEIN; HAEMEL; WOOD, 2003). Apesar de sua superexpressão, mutações do gene TP53 não ocorrem com frequência em melanomas cutâneos malignos (ALBINO et al., 1994; SPARROW et al., 1995b; WEISS et al., 1995).

Como os níveis de estabilidade de p53 selvagem são associados com um melhor prognóstico, pacientes com melanoma superficial mostraram período livre de recidiva maior e melhor sobrevida global quando não houve mutação de p53 (FLØRENES et al., 1994). Em contrapartida, estudos sugeriram que a expressão aumentada de p53 pode estar associada com um prognóstico pior (MCGREGOR et al., 1993; SPARROW et al., 1995a).

No presente estudo a porcentagem de células positivas para p53 foi maior que o citado anteriormente em neoplasias melanocíticas malignas de equinos, o que

poderia supor que a malignidade das lesões apresentadas fosse maior, porém, devido às informações obtidas com as características apresentadas no presente trabalho, acredita-se que esta afirmativa seja falsa. Mais trabalhos com amostragem maior devem ser feitos para estabelecer com propriedade os valores de referência para a positividade de p53 em neoplasias melanocíticas em equinos, uma vez que o trabalho citado apresenta uma pequena amostragem.

7 CONCLUSÕES

- 1 A análise dos dados clínicos reproduz o comportamento biológico atual encontrado na literatura para neoplasias melanocíticas de equinos, exceto devido à idade menor dos animais apresentados neste estudo.
- 2 A classificação histológica das neoplasias melanocíticas de equinos está de acordo com a literatura da espécie, apesar de haver diferenças sutis em alguns animais, como a quantidade de melanófagos e número de figuras de mitose.
- 3 As neoplasias melanocíticas deste estudo se assemelham a nevos azuis celulares em humanos e melanocitomas em cães.
- 4 O microarranjo de tecidos foi de utilidade na análise imunoistoquímica dos marcadores biológicos propostos de maneira econômica, rápida e com baixa variabilidade.
- 5 O índice de proliferação celular encontrado sugere que p53 e PCNA podem ser usados para a contagem mitogênica, sendo que o PCNA apresenta valores maiores.
- 6 A expressão da proteína p53, nos casos estudados, foi maior neste estudo, mostrando maior relação com a parada do ciclo celular que em outros estudos em equinos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi de extrema importância para complementar conhecimentos morfológicos e de expressão de proteínas das neoplasias melanocíticas encontradas em equinos. Além de lançar mão de uma técnica inovadora na veterinária, com grande potencial de ser utilizada em grande escala, em qualquer tipo de tecido, para a identificação de fenômenos nunca antes estudados.

Mais estudos devem ser feitos na área, uma vez que ainda há descobertas a serem feitas, como detalhes da classificação morfológica, a descoberta de mecanismos para o desenvolvimento tumoral e métodos de diagnóstico e prognóstico tumorais, já que não foi possível o acompanhamento clínico dos animais após a retirada das biópsias. A importância do p53 nestas neoplasias foi reveladora, uma vez que em estudos feitos em humanos e cães a expressão deste foi baixa, podendo revelar um tipo tumoral dependente da mutação de p53 em equinos.

REFERÊNCIAS

- ADEMA, G. J.; BAKKER, A. B.; DE BOER, A. J.; HOHENSTEIN, P.; FIGDOR, C. G. pMel17 is recognised by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-45 and HMB-50 and by anti-melanoma CTL. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 9, p. 1044-1048, 1996.
- ADEMA, G. J.; DE BOER, A. J.; VAN 'T HULLENAAR, R.; DENIJN, M.; RUITER, D. J.; VOGEL, A. M.; FIGDOR, C. G. Melanocyte lineage-specific antigens recognized by monoclonal antibodies NKI-beteb, HMB-50, and HMB-45 are encoded by a single cDNA. **The American Journal of Pathology**, v. 143, n. 6, p. 1579-1585, 1993.
- ADEMA, G. J.; DE BOER, A. J.; VOGEL, A. M.; LOENEN, W. A.; FIGDOR, C. G. Molecular characterization of the melanocyte lineage-specific antigen gp100. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 20126-20133, 1994.
- ALBINO, A. P.; VIDAL, M. J.; MCNUTT, N. S.; SHEA, C. R.; PRIETO, V. G.; NANUS, D. M.; PALMER, J. M.; HAYWARD, N. K. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 4, n. 1, p. 35-45, 1994.
- ALONSO, S. R.; ORTIZ, P.; POLLÁN, M.; PÉREZ-GÓMEZ, B.; SÁNCHEZ, L.; ACUÑA, M. J.; PAJARES, R.; MARTÍNEZ-TELLO, F. J.; HORTELANO, C. M.; PIRIS, M. A.; RODRÍGUEZ-PERALTO, J. L. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. **The American Journal of Pathology**, v. 164, n. 1, p. 193-203, 2004.
- ARGENYI, Z. B.; CAIN, C.; BROMLEY, C.; NGUYEN, A. V.; ABRAHAM, A. A.; KERSCHMANN, R.; LEBOT, P. E. S-100 protein-negative malignant melanoma: fact or fiction? A light-microscopic and immunohistochemical study. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 16, n. 3, p. 233-240, 1994.
- BAKER, S. J.; MARKOWITZ, S.; FEARON, E. R.; WILLSON, J. K.; VOGELSTEIN, B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. **Science**, v. 249, n. 4971, p. 912-915, 1990.
- BALCH, C. M.; GERSHENWALD, J. E.; SOONG, S. J.; THOMPSON, J. F.; ATKINS, M. B.; BYRD, D. R.; BUZAID, A. C.; COCHRAN, A. J.; COIT, D. G.; DING, S.; EGGERMONT, A. M.; FLAHERTY, K. T.; GIMOTTY, P. A.; KIRKWOOD, J. M.; MCMASTERS, K. M.; MIHM, M. C.; MORTON, D. L.; ROSS, M. I.; SOBER, A. J.; SONDAK, V. K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clinical Oncology**, v. 27, n. 36, p. 6199-6206, 2009.
- BARNHILL, R. L.; PIEPKORN, M.; BUSAM, K. J. **Pathology of Melanocytic Nevi and Malignant Melanoma**.: Springer-Verlag New York, Inc., 2003
- BATTIFORA, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Laboratory Investigation**, v. 55, n. 2, p. 244-248, 1986.

BERGMAN, R.; AZZAM, H.; SPRECHER, E.; MANOV, L.; MUNICHOR, M.; FRIEDMAN-BIRNBAUM, R.; BEN-ITZHAK, O. A comparative immunohistochemical study of MART-1 expression in Spitz nevi, ordinary melanocytic nevi, and malignant melanomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 496-500, 2000.

BERRINGTON, A. J.; JIMBOW, K.; HAINES, D. M. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 4, p. 455-461, 1994.

BEZDEKOVA, M.; BRYCHTOVA, S.; SEDLAKOVA, E.; STEIGEROVA, J.; HLOBILKOVA, A.; BIENOVA, M.; KUCEROVA, R.; BRYCHTA, T.; KREJCI, V.; KOLAR, Z. Immunohistochemical assessment of E-cadherin and beta-catenin in trichofolliculomas and trichoepitheliomas. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 151, n. 2, p. 251-255, 2007.

BLESSING, K.; SANDERS, D. S.; GRANT, J. J. Comparison of immunohistochemical staining of the novel antibody melan-A with S100 protein and HMB-45 in malignant melanoma and melanoma variants. **Histopathology**, v. 32, n. 2, p. 139-146, 1998.

BOX, N. F.; TERZIAN, T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 21, n. 5, p. 525-533, 2008.

BROUWENSTIJN, N.; SLAGER, E. H.; BAKKER, A. B.; SCHREURS, M. W.; VAN DER SPEK, C. W.; ADEMA, G. J.; SCHRIER, P. I.; FIGDOR, C. G. Transcription of the gene encoding melanoma-associated antigen gp100 in tissues and cell lines other than those of the melanocytic lineage. **British Journal of Cancer**, v. 76, n. 12, p. 1562-1566, 1997.

BUCHER, K.; SZALAI, G.; MARTI, E.; GRIOT-WENK, M. E.; LAZARY, S.; PAULI, U. Tumour suppressor gene p53 in the horse: identification, cloning, sequencing and a possible role in the pathogenesis of equine sarcoid. **Research Veterinary Science**, v. 61, n. 2, p. 114-119, 1996.

BUSAM, K. J. The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours. **Pathology**, v. 36, n. 5, p. 462-469, 2004.

BUSAM, K. J.; CHEN, Y. T.; OLD, L. J.; STOCKERT, E.; IVERSEN, K.; COPLAN, K. A.; ROSAI, J.; BARNHILL, R. L.; JUNGBLUTH, A. A. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 8, p. 976-982, 1998.

BUSAM, K. J.; JUNGBLUTH, A. A. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. **Advances of Anatomic Pathology**, v. 6, n. 1, p. 12-18, 1999.

CAMP, R. L.; CHARETTE, L. A.; RIMM, D. L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 80, n. 12, p. 1943-1949, 2000.

CARLSON, J. A.; ROSS, J. S.; SLOMINSKI, A. J. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 75-102, 2009.

CERRONI, L.; KERL, H. Tutorial on melanocytic lesions. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 23, n. 3, p. 237-241, 2001.

CHEN, Y. T.; STOCKERT, E.; JUNGBLUTH, A.; TSANG, S.; COPLAN, K. A.; SCANLAN, M. J.; OLD, L. J. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5915-5919, 1996.

COTCHIN, E. A general survey of tumours in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 9, n. 1, p. 16-21, 1977.

CROTTY, K.; MCCARTHY, S. W.; MIHM JR., M. C. The histologic diagnosis and classification of melanoma. In: J. F. M. M. Thompson, D.L, Kroon, B.B. (Ed.). **Textbook of melanoma: pathology, diagnosis and management**. London: Martin Dunitz, 2004, p.115-121

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

ESCLAMADO, R. M.; GOWN, A. M.; VOGEL, A. M. Unique proteins defined by monoclonal antibodies specific for human melanoma. Some potential clinical applications. **The American Journal of Surgery**, v. 152, n. 4, p. 376-385, 1986.

ESSNER, R.; KUO, C. T.; WANG, H.; WEN, D. R.; TURNER, R. R.; NGUYEN, T.; HOON, D. S. Prognostic implications of p53 overexpression in cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites. **Cancer**, v. 82, n. 2, p. 309-316, 1998.

FINTL, C.; DIXON, P. A review of five cases of parotid melanoma in the horse. **Equine Veterinary Education**, v., n., p. 17-24, 2001.

FLEURY, C.; BÉRARD, F.; BALME, B.; THOMAS, L. The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses (1): clinical-pathological characterization. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 1, p. 39-46, 2000a.

FLEURY, C.; BÉRARD, F.; LEBLOND, A.; FAURE, C.; GANEM, N.; THOMAS, L. The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses (2): epidemiological survey. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 1, p. 47-51, 2000b.

FLØRENES, V. A.; OYJORD, T.; HOLM, R.; SKREDE, M.; BØRRESEN, A. L.; NESLAND, J. M.; FODSTAD, O. TP53 allele loss, mutations and expression in malignant melanoma. **British Journal of Cancer**, v. 69, n. 2, p. 253-259, 1994.

FOLEY, G. L.; VALENTINE, B. A.; KINCAID, A. L. Congenital and acquired melanocytomas (benign melanomas) in eighteen young horses. **Vet erinary Pathology**, v. 28, n. 5, p. 363-369, 1991.

GAYNOR, R.; HERSCHMAN, H. R.; IRIE, R.; JONES, P.; MORTON, D.; COCHRAN, A. S100 protein: a marker for human malignant melanomas? **Lancet**, v. 1, n. 8225, p. 869-871, 1981.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H.; SCHWAB, U.; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **The Journal of Immunology**, v. 133, n. 4, p. 1710-1715, 1984.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, 1983.

GOULD ROTHBERG, B. E.; BRACKEN, M. B.; RIMM, D. L. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 7, p. 452-474, 2009.

GOWN, A. M.; VOGEL, A. M.; HOAK, D.; GOUGH, F.; MCNUTT, M. A. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. **The American Journal of Pathology**, v. 123, n. 2, p. 195-203, 1986.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J. Melanocytic Tumors. In: I. Mosby-Year Book (Ed.). **Veterinary Dermatopathology: A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline disease**. St. Louis, 1992, p.451-464

GUERRIERE-KOVACH, P. M.; HUNT, E. L.; PATTERSON, J. W.; GLEMBOCKI, D. J.; ENGLISH, J. C.; WICK, M. R. Primary melanoma of the skin and cutaneous melanomatous metastases: comparative histologic features and immunophenotypes. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 122, n. 1, p. 70-77, 2004.

HAASS, N.; SMALLEY, K.; LI, L.; HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 150-159, 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HARGIS, A. N. Sistema Tegumentar. In: A. Ltda (Ed.). **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. Porto Alegre, 1998, p.486-533

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, n. 4930, p. 629-634, 1989.

HAZAN, C.; MELZER, K.; PANAGEAS, K. S.; LI, E.; KAMINO, H.; KOPF, A.; CORDON-CARDO, C.; OSMAN, I.; POLSKY, D. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. **Cancer**, v. 95, n. 3, p. 634-640, 2002.

HENNER, J.; PONCET, P. A.; GUÉRIN, G.; HAGGER, C.; STRANZINGER, G.; RIEDER, S. Genetic mapping of the (G)-locus, responsible for the coat color phenotype "progressive greying with age" in horses (*Equus caballus*). **Mammalian Genome**, v. 13, n. 9, p. 535-537, 2002.

HERNBERG, M.; TURUNEN, J. P.; VON BOGUSLAWSKY, K.; MUHONEN, T.; PYRHÖNEN, S. Prognostic value of biomarkers in malignant melanoma. **Melanoma Research**, v. 8, n. 3, p. 283-291, 1998.

HERRERA, G. A.; PEÑA, J. R.; TURBAT-HERRERA, E. A.; KELLY, D. R.; SHULTZ, J. J. The diagnosis of melanoma: current approaches addressing tumor differentiation. **Pathology Annuary**, v. 29 Pt 1, n., p. 233-260, 1994.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 578-588, 2007.

HOFBAUER, G. F.; KAMARASHEV, J.; GEERTSEN, R.; BÖNI, R.; DUMMER, R. Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. **Melanoma Research**, v. 8, n. 4, p. 337-343, 1998.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEIN, B.; HARRIS, C. C. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49-53, 1991.

HSU, F. D.; NIELSEN, T. O.; ALKUSHI, A.; DUPUIS, B.; HUNTSMAN, D.; LIU, C. L.; VAN DE RIJN, M.; GILKS, C. B. Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. **Modern Pathology**, v. 15, n. 12, p. 1374-1380, 2002.

HUSSEIN, M. R.; HAEMEL, A. K.; WOOD, G. S. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 12, n. 2, p. 93-100, 2003.

ILMONEN, S.; HERNBERG, M.; PYRHÖNEN, S.; TARKKANEN, J.; ASKO-SELJAVAARA, S. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. **Melanoma Research**, v. 15, n. 5, p. 375-381, 2005.

IWAKUMA, T.; LOZANO, G. Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2177-2184, 2007.

JACKSON, R. Malignant melanoma: a review of 75 malpractice cases. **Internal Journal of Dermatology**, v. 36, n. 7, p. 497-498, 1997.

JAKOBIEC, F. A.; BHAT, P.; COLBY, K. A. Immunohistochemical studies of conjunctival nevi and melanomas. **Archives of Ophthalmology**, v. 128, n. 2, p. 174-183, 2010.

JAWHAR, N. M. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. **Annals of Saudi Medicine**, v. 29, n. 2, p. 123-127, 2009.

JUNGBLUTH, A. A.; BUSAM, K. J.; GERALD, W. L.; STOCKERT, E.; COPLAN, K. A.; IVERSEN, K.; MACGREGOR, D. P.; OLD, L. J.; CHEN, Y. T. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, n. 5, p. 595-602, 1998.

KAGESHITA, T.; KAWAKAMI, Y.; HIRAI, S.; ONO, T. Differential expression of MART-1 in primary and metastatic melanoma lesions. **Journal of Immunotherapy**, v. 20, n. 6, p. 460-465, 1997.

KALEEM, Z.; LIND, A. C.; HUMPHREY, P. A.; SUEPER, R. H.; SWANSON, P. E.; RITTER, J. H.; WICK, M. R. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? **Modern Pathology**, v. 13, n. 3, p. 217-222, 2000.

KALLIONIEMI, O. P.; WAGNER, U.; KONONEN, J.; SAUTER, G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 7, p. 657-662, 2001.

KANTER-LEWENSOHN, L.; HEDBLAD, M. A.; WEJDE, J.; LARSSON, O. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. **Modern Pathology**, v. 10, n. 9, p. 917-920, 1997.

KANTER, L.; BLEGEN, H.; WEJDE, J.; LAGERLÖF, B.; LARSSON, O. Utility of a proliferation marker in distinguishing between benign naevocellular naevi and naevocellular naevus-like lesions with malignant properties. **Melanoma Research**, v. 5, n. 5, p. 345-350, 1995.

KARLSSON, M.; BOERYD, B.; CARSTENSEN, J.; FRÅNLUND, B.; GUSTAFSSON, B.; KÅGEDAL, B.; SUN, X. F.; WINGREN, S. Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 32A, n. 2, p. 357-362, 1996.

KAWAKAMI, Y.; NISHIMURA, M. I.; RESTIFO, N. P.; TOPALIAN, S. L.; O'NEIL, B. H.; SHILYANSKY, J.; YANNELLI, J. R.; ROSENBERG, S. A. T-cell recognition of human melanoma antigens. **Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology**, v. 14, n. 2, p. 88-93, 1993.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, n. 6, p. 629-640, 1997.

KIRKHAM, N. Optimal handling and criteria for melanoma diagnosis. **Histopathology**, v. 37, n. 5, p. 467-469, 2000.

KLIGMAN, D.; HILT, D. C. The S100 protein family. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, n. 11, p. 437-443, 1988.

KOENIG, A.; WOJCIESZYN, J.; WEEKS, B. R.; MODIANO, J. F. Expression of S100a, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 38, n. 4, p. 427-435, 2001.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BÄRLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.

KORABIEWSKA, M.; MIRECKA, J.; BRINCK, U.; SZUTA, M.; STYPULKOWSKA, J.; WIESE, G.; BARTKOWSKI, S.; SCHAUER, A. Immunohistochemical demonstration of S100 protein in malignant melanomas of the facial skin and oral cavity. **Journal of Nihon University School of Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 117-121, 1994.

LADSTEIN, R. G.; BACHMANN, I. M.; STRAUME, O.; AKSLEN, L. A. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. **BMC Cancer**, v. 10, n., p. 140, 2010.

LANE, D. P. Worrying about p53. **Current Biology**, v. 2, n. 11, p. 581-583, 1992.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 62-70, 2002.

LI, L. X.; CROTTY, K. A.; KRIL, J. J.; PALMER, A. A.; MCCARTHY, S. W. Method of melanin bleaching in MIB1-Ki67 immunostaining of pigmented lesions: A quantitative evaluation in malignant melanomas. **The Histochemical Journal**, v. 31, n. 4, p. 237-240, 1999.

LINDEN, M. D.; TORRES, F. X.; KUBUS, J.; ZARBO, R. J. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 97, n. 5 Suppl 1, p. S4-13, 1992.

LOGGINI, B.; RINALDI, I.; PINGITORE, R.; CRISTOFANI, R.; CASTAGNA, M.; BARACHINI, P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance. **Tumori**, v. 87, n. 3, p. 179-186, 2001.

LOPES, M. A.; WHITE, N. A., 2ND. Parenteral nutrition for horses with gastrointestinal disease: a retrospective study of 79 cases. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 250-257, 2002.

LOZANO, G.; ZAMBETTI, G. P. What have animal models taught us about the p53 pathway? **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 206-220, 2005.

MACGILLIVRAY, K. C.; SWEENEY, R. W.; DEL PIERO, F. Metastatic melanoma in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 4, p. 452-456, 2002.

MCGREGOR, J. M.; YU, C. C.; DUBLIN, E. A.; BARNES, D. M.; LEVISON, D. A.; MACDONALD, D. M. p53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. **British Journal of Dermatology**, v. 128, n. 6, p. 606-611, 1993.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M. Y.; SCHITTEK, B.; GARBE, C.; HERLYN, M. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, n., p. D1005-1010, 1998.

MILLANTA, F.; FRATINI, F.; CORAZZA, M.; CASTAGNARO, M.; ZAPPULLI, V.; POLI, A. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 45-51, 2002.

MOORE, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, n. 6, p. 739-744, 1965.

MORETTI, S.; SPALLANZANI, A.; CHIARUGI, A.; FABIANI, M.; PINZI, C. Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 44, n. 2, p. 188-192, 2001.

NASIR, L.; ARGYLE, D. J.; MCFARLANE, S. T.; REID, S. W. Nucleotide sequence of a highly conserved region of the canine p53 tumour suppressor gene. **DNA Sequence**, v. 8, n. 1-2, p. 83-86, 1997.

NASIR, L.; REID, S. W. Nucleotide sequence of exons 5 to 9 of the p53 tumour-suppressor gene of the donkey (*Equus asinus*). **DNA Sequence**, v. 6, n. 1, p. 61-63, 1995.

NASIR, L.; REID, S. W. Nucleotide sequence of exons 5 to 9 of the p53 tumour-suppressor gene of the horse (*Equus caballus*). **DNA Sequence**, v. 6, n. 3, p. 185-187, 1996.

NASR, M. R.; EL-ZAMMAR, O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 30, n. 2, p. 117-122, 2008.

NAZARIAN, R. M.; PRIETO, V. G.; ELDER, D. E.; DUNCAN, L. M. Melanoma biomarker expression in melanocytic tumor progression: a tissue microarray study. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 37 Suppl 1, n., p. 41-47, 2010.

NOCITO, A.; BUBENDORF, L.; TINNER, E. M.; SÜESS, K.; WAGNER, U.; FORSTER, T.; KONONEN, J.; FIJAN, A.; BRUDERER, J.; SCHMID, U.; ACKERMANN, D.; MAURER, R.; ALUND, G.; KNÖNAGEL, H.; RIST, M.; ANABITARTE, M.; HERING, F.; HARDMEIER, T.; SCHOENENBERGER, A. J.; FLURY, R.; JÄGER, P.; FEHR, J. L.; SCHRAML, P.; MOCH, H.; MIHATSCH, M. J.; GASSER, T.; SAUTER, G. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. **The Journal of Pathology**, v. 194, n. 3, p. 349-357, 2001a.

NOCITO, A.; KONONEN, J.; KALLIONIEMI, O. P.; SAUTER, G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 1, p. 1-5, 2001b.

OHMURO, K.; OKADA, K.; SATOH, A.; MURAKAMI, K.; SATAKE, S.; ASAHINA, M.; NUMAKUNAI, S.; OHSHIMA, K. Morphogenesis of compound melanosomes in melanoma cells of a gray horse. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 4, p. 677-680, 1993.

OHSIE, S.; SARANTOPOULOS, G.; COCHRAN, A.; BINDER, S. Immunohistochemical characteristics of melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 35, n. 5, p. 433-444, 2008.

PACIFICO, M. D.; GROVER, R.; RICHMAN, P. I.; DALEY, F. M.; BUFFA, F.; WILSON, G. D. Development of a tissue array for primary melanoma with long-term

follow-up: discovering melanoma cell adhesion molecule as an important prognostic marker. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 115, n. 2, p. 367-375, 2005.

PALMER, A. A.; HALL, B. E.; LEW, M. A comparison of some methods for identifying amelanotic and oligomelanotic melanoma metastases in paraffin sections. **Pathology**, v. 17, n. 2, p. 335-339, 1985.

PASCOE, R. R.; SUMMERS, P. M. Clinical survey of tumours and tumour-like lesions in horses in south east Queensland. **Equine Veterinary Journal**, v. 13, n. 4, p. 235-239, 1981.

POREMBA, C.; YANDELL, D. W.; METZE, D.; KAMANABROU, D.; BÖCKER, W.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B. Immunohistochemical detection of p53 in melanomas with rare p53 gene mutations is associated with mdm-2 overexpression. **Oncology Research**, v. 7, n. 7-8, p. 331-339, 1995.

RABANAL, R. H.; FONDEVILA, D. M.; MONTANÉ, V.; DOMINGO, M.; FERRER, L. Immunocytochemical diagnosis of skin tumours of the dog with special reference to undifferentiated types. **Research in Veterinary Science**, v. 47, n. 1, p. 129-133, 1989.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, M. E.; MILLER, M. A.; JOHNSON, G. C.; PACE, L. W.; FARD, A.; KOTTLER, S. J. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RAMSAY, J. A.; FROM, L.; ISCOE, N. A.; KAHN, H. J. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, n. 1, p. 22-26, 1995.

REDDY, V. B.; GATTUSO, P.; ARANHA, G.; CARSON, H. J. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 22, n. 3, p. 248-251, 1995.

RIEDER, S.; STRICKER, C.; JOERG, H.; DUMMER, R.; STRANZINGER, G. A comparative genetic approach for the investigation of ageing grey horse melanoma. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 117, n., p. 73-82, 2000.

RIEGER, E.; HOFMANN-WELLENHOF, R.; SOYER, H. P.; KOFLER, R.; CERRONI, L.; SMOLLE, J.; KERL, H. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, n. 3, p. 229-236, 1993.

RILEY, T.; SONTAG, E.; CHEN, P.; LEVINE, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 402-412, 2008.

RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. F. Functional loss of p21/Waf-1 in a case of benign canine multicentric melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 2, p. 94-101, 1998.

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. **The Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 1, p. 13-24, 1999.

ROELS, S.; TILMANT, K.; VAN DAELE, A.; VAN MARCK, E.; DUCATELLE, R. Proliferation, DNA ploidy, p53 overexpression and nuclear DNA fragmentation in six equine melanocytic tumours. **Journal of Veterinary Medicine A Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 47, n. 7, p. 439-448, 2000.

SÁNCHEZ, J.; RAMIREZ, G. A.; BUENDIA, A. J.; VILAFRANCA, M.; MARTINEZ, C. M.; ALTIMIRA, J.; NAVARRO, J. A. Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 5, p. 676-682, 2007.

SANDUSKY, G. E.; CARLTON, W. W.; WIGHTMAN, K. A. Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. **Veterinary Pathology**, v. 24, n. 6, p. 495-499, 1987.

SANDUSKY, G. E.; CARLTON, W. W.; WIGHTMAN, K. A. Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 6, p. 577-581, 1985.

SCHILLER, I.; LU, Z. H.; VAUGHAN, L.; WEILENMANN, R.; KOUNDRIOUKOFF, S.; POSPISCHIL, A. Establishment of proliferative cell nuclear antigen gene as an internal reference gene for polymerase chain reaction of a wide range of archival and fresh mammalian tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 6, p. 585-588, 2003.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SCHÖNIGER, S.; SUMMERS, B. Equine skin tumours in 20 horses resembling three variants of human melanocytic naevi. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 165-173, 2009.

SELTENHAMMER, M.; HEERE-RESS, E.; BRANDT, S.; DRUML, T.; JANSEN, B.; PEHAMBERGER, H.; NIEBAUER, G. Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma. **Pigment Cell Research**, v. 17, n. 6, p. 674-681, 2004.

SELTENHAMMER, M.; SIMHOFER, H.; SCHERZER, S.; ZECHNER, R.; CURIK, I.; SÖLKNER, J.; BRANDT, S.; JANSEN, B.; PEHAMBERGER, H.; EISENMENGER, E. Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 153-157, 2003.

SHARPLESS, N. E.; BARDEESY, N.; LEE, K. H.; CARRASCO, D.; CASTRILLON, D. H.; AGUIRRE, A. J.; WU, E. A.; HORNER, J. W.; DEPINHO, R. A. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. **Nature**, v. 413, n. 6851, p. 86-91, 2001.

SHERGILL, I. S.; SHERGILL, N. K.; ARYA, M.; PATEL, H. R. Tissue microarrays: a current medical research tool. **Current Medical Research and Opinion**, v. 20, n. 5, p. 707-712, 2004.

SKACEL, M.; SKILTON, B.; PETTAY, J. D.; TUBBS, R. R. Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 10, n. 1, p. 1-6, 2002.

SKELTON, H. G.; MACEIRA, J.; SMITH, K. J.; MCCARTHY, W. F.; LUPTON, G. P.; GRAHAM, J. H. HMB45 negative spindle cell malignant melanoma. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 19, n. 6, p. 580-584, 1997.

SKELTON, H. G.; SMITH, K. J.; BARRETT, T. L.; LUPTON, G. P.; GRAHAM, J. H. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions. A reflection of cellular activation. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 13, n. 6, p. 543-550, 1991.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; CARLSON, A. J.; MATSUOKA, L. Y.; BALCH, C. M.; MIHM, M. C. Malignant melanoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 125, n. 10, p. 1295-1306, 2001.

SMITH, S.; GOLDSCHMIDT, M.; MCMANUS, P. A comparative review of melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002.

SMOLLER, B. R.; HSU, A.; KRUEGER, J. HMB-45 monoclonal antibody recognizes an inducible and reversible melanocyte cytoplasmic protein. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 18, n. 5, p. 315-322, 1991.

SOUSSI, T.; CARON DE FROMENTEL, C.; MAY, P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, v. 5, n. 7, p. 945-952, 1990.

SPARROW, L. E.; ENGLISH, D. R.; HEENAN, P. J.; DAWKINS, H. J.; TARAN, J. Prognostic significance of p53 over-expression in thin melanomas. **Melanoma Research**, v. 5, n. 6, p. 387-392, 1995a.

SPARROW, L. E.; SOONG, R.; DAWKINS, H. J.; IACOPETTA, B. J.; HEENAN, P. J. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. **Melanoma Research**, v. 5, n. 2, p. 93-100, 1995b.

SUNDBERG, J. P.; BURNSTEIN, T.; PAGE, E. H.; KIRKHAM, W. W.; ROBINSON, F. R. Neoplasms of Equidae. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 170, n. 2, p. 150-152, 1977.

SUNDRAM, U.; HARVELL, J.; ROUSE, R.; NATKUNAM, Y. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and MelanA. **Modern Pathology**, v. 16, n. 8, p. 802-810, 2003.

SVIATOKHA, V.; TANI, E.; KLEINA, R.; SPERGA, M.; SKOOG, L. Immunohistochemical analysis of the S100A1, S100B, CD44 and Bcl-2 antigens and the rate of cell proliferation assessed by Ki-67 antibody in benign and malignant melanocytic tumours. **Melanoma Research**, v. 20, n. 2, p. 118-125, 2010.

TALVE, L. A.; COLLAN, Y. U.; EKFOR, T. O. Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 23, n. 4, p. 335-343, 1996.

TERZIAN, T.; SUH, Y. A.; IWAKUMA, T.; POST, S. M.; NEUMANN, M.; LANG, G. A.; VAN PELT, C. S.; LOZANO, G. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. **Genes and Development**, v. 22, n. 10, p. 1337-1344, 2008.

TIETZE, M. K.; CHIN, L. Murine models of malignant melanoma. **Molecular Medicine Today**, v. 6, n. 10, p. 408-410, 2000.

TOLEDO, F.; WAHL, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature Reviews. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 909-923, 2006.

TROXEL, D. B. Pitfalls in the diagnosis of malignant melanoma: findings of a risk management panel study. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 9, p. 1278-1283, 2003.

VALENTINE, B. Equine cutaneous non-neoplastic nodular and proliferative lesions in the Pacific Northwest. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 6, p. 425-428, 2005.

VALENTINE, B. Survey of equine cutaneous neoplasia in the Pacific Northwest. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 1, p. 123-126, 2006.

VALENTINE, B. A. Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 291-297, 1995a.

VALENTINE, B. A. Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 291-297, 1995b.

VELDHOEN, N.; MILNER, J. Isolation of canine p53 cDNA and detailed characterization of the full length canine p53 protein. **Oncogene**, v. 16, n. 8, p. 1077-1084, 1998.

VOGT, T.; ZIPPERER, K. H.; VOGT, A.; HÖLZEL, D.; LANDTHALER, M.; STOLZ, W. p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. **Histopathology**, v. 30, n. 1, p. 57-63, 1997.

WAN, W. H.; FORTUNA, M. B.; FURMANSKI, P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. **Journal of Immunological Methods**, v. 103, n. 1, p. 121-129, 1987.

WEISS, J.; HEINE, M.; KÖRNER, B.; PILCH, H.; JUNG, E. G. Expression of p53 protein in malignant melanoma: clinicopathological and prognostic implications. **British Journal of Dermatology**, v. 133, n. 1, p. 23-31, 1995.

WEN, F.; SHEN, A.; SHANAS, R.; BHATTACHARYYA, A.; LIAN, F.; HOSTETTER, G.; SHI, J. Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 17, n. 10, p. 2619-2627, 2010.

WOLLINA, U.; KILIAN, U.; HENKEL, U.; SCHAARSCHMIDT, H.; KNOPF, B. The initial steps of tumor progression in melanocytic lineage: a histochemical approach. **Anticancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1405-1414, 1991.

ZEMBOWICZ, A.; MIHM, M. C. Dermal dendritic melanocytic proliferations: an update. **Histopathology**, v. 45, n. 5, p. 433-451, 2004.

ZIMMER, D. B.; CORNWALL, E. H.; LANDAR, A.; SONG, W. The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Research Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 417-429, 1995.