TARSO FELIPE TEIXEIRA

Melanomas melânicos e amelanicos da
cavidade bucal de cães: aspectos
epidemiológicos, morfológicos e moleculares

São Paulo
2011

TARSO FELIPE TEIXEIRA

Melanomas melânicos e amelanicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli

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)

T.2414
FMVZ

Teixeira, Tarso Felipe

Melanomas melânicos e amelanicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares / Tarso Felipe Teixeira. -- 2011.

139 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli.

1. Melanoma. 2. Amelanico. 3. Conexinas. 4. Caderina-E.
5. Metaloproteinases. I. Título.

ERRATA

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1	138 f.	139 f.
Abstract	1	138 f.	139 f.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Quantificação da expressão das conexinas 26, 32 e 43 da Caderina-E e da metaloproteinase 2 (MMP2) em melanomas da espécie canina”, protocolado sob o nº1311/2008, utilizando 25 (vinte e cinco) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, 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 na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research “Quantification of connexinas 26, 32, 43 expression, E-Cadherin and metalloproteinase 2 (MMP2) in canine specie with melanoma”, utilizing 25 (twenty five) dogs, protocol number 1311/2008, under the responsibility Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, 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 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: TEIXEIRA, Tarso Felipe

Título: Melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares.

Tese 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 Doutor em Ciências

Data____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Assinatura:_____

Julgamento:_____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Confesso a vocês que esta é a parte que mais gosto de escrever
pois é o momento que permite estar comigo mesmo, e refletir sobre todo o caminho
percorrido nestes quatro anos de doutorado até a proximidade da última conquista.
...lembrar de todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente e me permitiram
alcançar este objetivo....portanto, este é o melhor momento para se praticar um sentimento
que considero a mãe de todos os outros: **A GRATIDÃO...**

JOÃO E SÔNIA

.....pais eternos, anjos que me guardam, luz que me guiam..
.....espíritos de luz.
.....**OBRIGADO** por estarem presentes sempre que os chamo!

TARCÍSIO E SUELI

pais verdadeiros, que me criam, educam, me encaminham...
sou grato a vocês por tudo!

TINO LUZY

sogros queridos, pais postíços.....

SADA, LINO, ADELAIDE, ODÚLIO

avós eternos
nos sonhos mato a saudades e me lembro de vocês nos nossos melhores momentos...
fazendo destas horas momentos felizes e infinitos.

SAUDOSA THILA E QUERIDAS LOREN E SUZY

filhas caninas que me fizeram crescer como veterinário
me ensinaram a acreditar numa amizade sincera entre espécies distintas
...amizade sem interesse...
despertaram em mim o sentimento da compaixão.....

TIO CARLOS

.....saudades eterna....e doída...
de um tio que me deixou diversas lições...
no entanto, a melhor de todas elas...
o sentimento da alegria....

HEITOR.....“ao meu príncipe de Tróia” “grande guerreiro”

....meu amado filho...me ensinou o verdadeiro sentido da coragem...da luta...da força
.....despertou em mim o medo da partida outra vez..... da paternidade.....
.....do amor sem limites, puro e incondicional..... o amor verdadeiro, entre pai e filho.....

VALÉRIA

qualquer coisa que lhe dissesse não caberia nesta tese...
fonte inspiradora de um amor inesgotável!
apoio incondicional e emocional em todos os momentos
sem dúvida, me carregou em seus braços, até aqui!
OBRIGADO!!

CYNTHIA

não poderia deixar de citá-la.
me lembro como se fosse hoje, na defesa de Mestrado você estava lá....
saudades do nosso convívio no laboratório, de suas risadas marotas.
da sua irritante calma e paciência eternas.....
OBRIGADO POR TUDO E QUE DEUS ILUMINE SEU CAMINHO.

ANDRÉA, FLÁVIA, JOÃO E RÉGIS

irmãos de sangue e de alma
sem vocês eu não seria tão feliz

XAN, EDUARDO, ERIVELTON, MARTA, CAMILA, JULIANA

irmãos de fé, queridos cunhados
caminhando sempre ao meu lado

**LIZANDRA, ISABELLE, IZADORA, VILLENO, VINÍCIUS, ANNA JÚLIA,
MANUELA,..ufa.....**

amados sobrinhos
quantas vezes fizeram de meus momentos de estresse, minutos de alegria
sempre me aliviando das horas mais tensas...
obrigado por me fazerem rir a cada dia com vocês!

Dedico este trabalho
primeiramente a minha orientadora :

Profa Dra Maria Lucia Zaidan Dagli

por ter confiado em mim, me entregando um presente que foi esta TESE.
trabalhar com a senhora foi muito gratificante, um aprendizado contínuo,
apoio em todos os momentos sem me permitir esmorecer...grande generosidade....

Muito obrigado por tudo

Ao Prof. Dr. José Luiz Guerra

grande mestre e amigo que me orientou durante o mestrado....me guiou até aqui...
agradeço por ter acreditado em mim e por ter aberto as portas da pesquisa

Ao meu tio Sérgio Mantovani (“No hair”)

por ter me oferecido todo suporte necessário durante a graduação, graças ao senhor hoje estou formado.

Ao Prof. Dr Marco Antônio Gioso

agradeço imensamente por ter contribuído com esta pesquisa e por abrir as portas do LOC.
também aproveito para agradecer a toda a sua equipe e pós-graduandos, pois sem vocês eu não teria conseguido dar seqüência na pesquisa com a tranqüilidade necessária.

Ao Prof. Dr. Luciano de Moraes Pinto

quem me iniciou na pesquisa científica durante a graduação.
sem dúvida um grande amigo.

Ao Prof. Dr. Edson Pereira Rodrigues

por ter despertado em mim o amor a patologia...um grande amigo....
se mostrou sempre solícito e disposto a ajudar quando precisei

A Profa Dra Júlia Matera

por ter contribuído com esta pesquisa e por ter aberto as portas da cirurgia e apoio incondicional.

Ao Dr Marco Antônio Leon Roman

responsável pelos procedimentos cirúrgicos, me ajudou muito.

Ao Rodrigo Ubukata e a equipe da PROVET

que me ensinou muito do que eu sei sobre oncologia
abriu as portas da Provet, fonte inesgotável do saber
me permitiu coletar alguns materiais, contribuindo muito para o andamento deste trabalho.

Aos meus eternos amigos de laboratório

A querida Marguiti (“Magnólia”)

Sem você, as coisas teriam sido muito mais difíceis
obrigado por dedicar horas de seu precioso tempo a me socorrer, sempre que supliquei por sua querida presença.

foram momentos maravilhosos de convivência.....eterna amiga.. uma mãezona....

Obrigado mesmo!

Ao **Greg** (“Gregório”)

sua chegada no laboratório contribuiu muito na minha formação como pesquisador

Ao **Lucas** (“Chaibão”; “Ludovico”)

sempre disposto a ajudar, contribuiu muito com esta tese.

Ao **Daniel** (“Bombinha”; “Dani Bananinha”)

um cara, sem dúvida, com quem posso contar.

A **Márcia Nagamine**

sempre deixou suas coisas de lado para me socorrer. **Muito obrigado por tudo.**

A **Elizângela**

grata surpresa, sempre disposta a me ajudar.

Aos amigos **Tereza, Bruno, Marcelo Monte Mor, Krishina, Kátia Kimura, Ivone**

a vocês também meu **muito obrigado por tudo** que fizeram por mim e pelo grato e eterno convívio no laboratório.

Aos **diretores** da Associação Brasileira de Oncologia Veterinária (**ABROVET**)

que compreenderam minha ausência em algumas reuniões em detrimento dos compromissos com a pesquisa.

Aos técnicos **Luciano** (“Buga”); **Raimundo, Cláudio, Livia e Edson**

As secretárias **Cristina, Cláudia e Shirley**

As funcionárias **Helena** (Biblioteca); **Lúcia** (Café); **Rosiris, Idalina e Herculano** (Biotério)

agradeço o carinho com que sempre me trataram!

ENFIM...AQUELES QUE NÃO CITEI, CONSIDEREM-SE HOMENAGEADOS E SEM DÚVIDA AGRADECIDOS, POR TEREM FEITO PARTE DIRETA OU INDIRETAMENTE DE MINHA VIDA E EVOLUÇÃO PROFISSIONAL

Agradeço a todos os proprietários que autorizaram a pesquisa, contribuindo assim, para o avanço no entendimento e cura contra o câncer.

Agradeço a todos os pacientes que fizeram parte desta pesquisa.

Estrada Nova – (Ao meu filho Heitor)

Eu conheço o medo de ir embora
Não saber o que fazer com a mão
Gritar pro mundo e saber
Que o mundo não presta atenção
Eu conheço o medo de ir embora
Embora não pareça, a dor vai passar
Lembra se puder
Se não der, esqueça
De algum jeito vai passar
O sol já nasceu na estrada nova
E mesmo que eu impeça, ele vai brilhar
Lembra se puder
Se não der esqueça
De algum jeito vai passar
Eu conheço o medo de ir embora
O futuro agarra a sua mão
Será que é o trem que passou
Ou passou quem fica na estação?
Eu conheço o medo de ir embora
E nada que interessa se pode guardar
Lembra se puder
Se não der, esqueça
De algum jeito vai passar

(Oswaldo Monte Negro)

Gostaria que esta música fizesse parte de nossas vidas, de uma lembrança doída, pois foi a ela que me apeguei, para matar a saudades, enquanto estivemos distantes....

RESUMO

TEIXEIRA, T. F. Melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares. [Melanotic and amelanotic melanomas from the buccal cavity of dogs: epidemiological, morphological and molecular aspects]. 2011. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Melanoma é uma neoplasia maligna com comportamento agressivo considerado o câncer mais comum da cavidade bucal de cães. Ele pode ser classificado quanto a morfologia celular em epitelióide, fusiforme e misto ou quanto ao fenótipo: melânico ou amelânico. Estudos têm sugerido que os melanomas amelânicos são mais agressivos. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento dos melanomas da cavidade bucal dos cães, quantificando a expressão das Cx26 e 43, caderina-E, MMPs 2 e 9 e proliferação celular. Para tanto foram coletados 25 melanomas provenientes de cães atendidos no HOVET – FMVZ-USP (16 melânicos e 9 amelânicos). Após a cirurgia os animais foram acompanhados até a morte, sendo que 5 animais foram eutanasiados (2 antes da cirurgia e 3 após o procedimento cirúrgico, devido ao sofrimento físico). Os tumores eram diagnosticados através do histopatológico e classificados de acordo com OMS (1998). Para confirmação dos melanomas amelânicos foi utilizado a técnica de imuno-histoquímica com o perfil de anticorpos pré-estabelecidos. A proliferação celular foi quantificada através do uso de PCNA, índice apoptótico e caspase-3. O comportamento tumoral foi avaliado através da técnica de imuno-histoquímica para caderina-E e MMPs 2 e 9. E a expressão das Cxs foram avaliadas através da imunofluorescência e western blot. Cães com melanoma amelânico apresentaram menor sobrevida, com aumento do número de metástase, fraca marcação para caderina-E e alta intensidade para as MMPs 2 e 9, aumento de células positivas para PCNA e índice mitótico, e diminuição da caspase-3, não havendo diferença significativa quanto aos tipos histotógicos. Houve diminuição de expressão das Cxs entre os amelânicos, no entanto, aumento da síntese do gene de CX 26 entre o mesmo grupo, o que se verificou através do PCR em Tempo Real. Nossos achados sugerem que os melanomas da cavidade bucal de cães apresentam um comportamento mais agressivo

Palavras-chave: Melanoma. Amelânico. Conexinas. Caderina-E. Metaloproteinases.

ABSTRACT

TEIXEIRA, T. F. Melanotic and amelanotic melanomas from the buccal cavity of dogs: epidemiological, morphological and molecular aspects [Melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares]. 2011. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Melanoma is a malignant neoplasm with aggressive behavior considered the most common cancer of the buccal cavity in dogs. It can be classified as cell morphology in epithelioid, spindle and mixed or on the phenotype, in melanotic or amelanotic. Studies have suggested that amelanotic melanomas are more aggressive. The aim of this study was to evaluate the behavior of melanoma of the buccal cavity of dogs, quantifying the expression of Connexins 26 and 43, E-cadherin, MMPs 2 and 9 and cell proliferation. For both melanomas were collected from 25 dogs attended at HOVET – FMVZ (USP) (16 melanotic and 9 amelanotic melanomas). After the surgery, the animals were followed until death, so 5 animals were euthanized (2 before surgery and 3 after surgery, due to physical suffering). The tumors were diagnosed by histopathology and classified according to WHO (1998). For confirmation of amelanotic melanomas it was used the technique of immune-histochemistry with the antibody profile pre-established. Cell proliferation was quantified by using PCNA, apoptotic index and caspase-3. The tumor behavior was evaluated using the technique of immune-histochemistry for E-cadherin and MMPs 2 and 9. And the expression of Cxs was evaluated by immune-fluorescence and western blot. Dogs with amelanotic melanoma had lower survival with increasing number of metastatic, weak immunoreactivity for E-cadherin and high intensity for MMP 2 and 9, an increase of cells positive for PCNA and mitotic index, and decreased caspase-3, no significant difference in the morphologic subtypes. There was a decrease of expression of Cxs between amelanotic, however, increased synthesis of CX 26 gene among the same group, which was verified by real time PCR. Our findings suggest that melanomas of the buccal cavity of dogs exhibited more aggressive behavior.

Key words: Melanoma. Amelanotic. Connexins. E-Cadherin. Metalloproteinases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto microscópica de melanócito (seta vermelha) e desenho esquemático da homeostasia entre a interação melanócito e queratinócito.....	27
Figura 2 - Desenho esquemático que representa as camadas da pele e evidencia um quadro de desenvolvimento de melanoma.....	33
Figura 3 - Foto macroscópica de invasão vertical de melanoma maxila de cão.....	34
Figura 4 - Foto macroscópica de lesões múltiplas de melanoma em pele de cão e foto macroscópica de melanoma em mandíbula de cães. Lesão hemorrágica, ulcerada e de consistência firme.....	35
Figura 5 - Modelo esquemático da organização da placa juncional.....	40
Figura 6 - Desenho esquematizado dos possíveis arranjos dos <i>conexons</i> nos canais de CIJG.....	41
Figura 7 - Topologia da molécula de conexina.....	48
Figura 8 - Cão da raça doberman, atendido pelos residentes no Laboratório de Odontologia. Cão da raça Pastor Alemão Branco, eutanasiado após a confirmação de metástase em pulmão e linfonodos e sofrimento físico do animal.....	72
Figura 9 - Foto macroscópica de melanoma em maxila esquerda e direita de cão. Sutura em palato mole após procedimento cirúrgico.....	80
Figura 10 - Fotomicrografia da morfologia dos melanomas melânicos, quanto aos três tipos histológicos.....	81
Figura 11 - Fotomicrografia da morfologia dos melanomas amelânicos: quanto aos três tipos histológicos	82
Figura 12 – Fotomicrografia correspondente às células de melanomas amelânicos corados pela técnica de imuno-histoquímica.....	83
Figura 13 – Intensidades da marcação da caderina-E pela técnica de imuno-histoquímica....	87
Figura 14 – Marcação das células de melanoma para PCNA pela imuno-histoquímica.....	88

Figura 15 - Fotomicrografia da marcação da caspase-3 pela técnica de imuno-histoquímica..	90
Figura 16 - Intensidade da marcação da Metaloproteinase 2 pela imuno-histoquímica.....	92
Figura 17 - Intensidade da marcação da Metaloproteinase 9 pela imuno-histoquímica.....	96
Figura 18 - Fotomicrografia da camada epitelial, marcação da Cx26 e Cx 43 pela imuno-histoquímica.....	100
Figura 19 - Marcação e localização da Cx26, quanto aos três tipos histológicos de melanoma pela imuno-fluorescência.....	101
Figura 20- Marcação e localização da Cx26, quanto aos fenótipos de melanoma pela imuno-fluorescência	101
Figura 21 - Controles positivo e negativo para Cx26 pela técnica de imuno-fluorescência...	102
Figura 22 - Marcação e localização da Cx43, quanto aos três tipos histológicos de melanoma pela imuno-fluorescência.....	103
Figura 23 - Marcação e localização da Cx43, quanto aos fenótipos de melanoma pela imuno-fluorescência	103
Figura 24 - Controles positivo e negativo para Cx43 pela técnica de imuno-fluorescência...	104
Figura 25 – Análises qualitativa e quantitativa da Cx26, entre os três tipos histológicos do melanoma, pelo Western Blot.....	105
Figura 26 - Análises qualitativa e quantitativa da Cx26, entre os fenótipos de melanoma, pelo Western Blot.....	106
Figura 27 - Análises qualitativa e quantitativa da Cx43, entre os três tipos histológicos do melanoma, pelo Western Blot.....	107
Figura 28 - Análises qualitativa e quantitativa da Cx43, entre os fenótipos de melanoma, pelo Western Blot.....	107
Figura 29 - Desenho esquemático – síntese das conexinas durante a cancerogênese.....	121

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de Kaplan Meier entre os três tipos histológicos de melanoma.....	78
Gráfico 2 - Curva de Kaplan Meier entre os fenótipos de melanoma	79
Gráfico 3 - Análise estatística da marcação PCNA (morfologia e fenótipo) dos melanomas..	89
Gráfico 4 - Análise estatística do índice mitótico morfologia e fenótipo) dos melanomas.....	89
Gráfico 5 - Análise quantitativa da marcação para Caspase – 3 (morfologia e fenótipo) dos melanomas.....	91
Gráfico 6 - Análise quantitativa da marcação da Metaloproteinase 2.....	95
Gráfico 7 - Análise quantitativa da marcação da Metaloproteinase 9.....	99
Gráfico 8 - Análise quantitativa do PCR Tempo Real para Cx26.....	108
Gráfico 9 - Análise quantitativa do PCR Tempo Real para Cx43.....	109
Gráfico 10 - Análise quantitativa do PCR Tempo Real para MMP2.....	110
Gráfico 11 - Análise quantitativa do PCR Tempo Real para MMP9.....	110
Gráfico 12 - Análise quantitativa do PCR Tempo Real para Caderina-E.....	111

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Nomenclaturas utilizadas para as conexinas e suas localizações.....	44
Quadro 2 - Distribuição tecidual das conexinas nos mamíferos.....	46
Quadro 3 - Distribuição das conexinas entre as glândulas endócrinas.....	47
Quadro 4 - Doenças genéticas relacionadas às mutações das conexinas	49
Quadro 5 - Anticorpos utilizados para a técnica de imuno-histoquímica.....	64
Quadro 6 - Histórico clínico e epidemiológico dos pacientes e melanomas.....	74
Quadro 7 – Intensidade da marcação tumoral da caderina-E entre os três tipos histológicos..	86
Quadro 8 - Intensidade da marcação tumoral da caderina-E entre os fenótipos	87
Quadro 9 - Intensidade da marcação tumoral da MMP2 entre os três tipos histológicos.....	93
Quadro 10 - Intensidade da marcação tumoral da MMP2 entre os fenótipos	94
Quadro 11 - Intensidade da marcação tumoral da MMP9 entre os três tipos histológicos.....	97
Quadro 12 - Intensidade da marcação tumoral da MMP9 entre os fenótipos	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas dos animais atendidos com melanoma, referente aos três tipos histológicos.....76

Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos animais atendidos com melanoma, referente aos fenótipos.....77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA.....	Análise de Variância de duas vias
AMPc.....	Adenilato ciclase
AO.....	Ácido Oxálico
Ca.....	Cálcio
CIJG.....	Canais intercelulares de junções <i>gap</i>
Cxs.....	Conexinas
FMVZ.....	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g.....	Gramas
HOVET.....	Hospital Veterinário
IC.....	Intercelular
IF.....	Imuno-fluorescência
IHQ.....	Imuno-histoquímica
JIG.....	Junções intercelulares tipo <i>gap</i>
kDa.....	KiloDáltons
kg.....	Kilograma
KMNO.....	Permanganato de Potássio
M.....	Mol
MG.....	Miligrama
ml.....	Milímetro
MMPs.....	Metaloproteinases
Nm.....	Nanômetro
PCNA.....	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR.....	Reação Polimerase em Cadeia
WB.....	Western Blot
µm ²	Micrômetros quadrados

TERMOS EM INGLÊS

cDNA – fita de ácido desorribonucléico complementar a ácido ribonucléico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína

DNA – ácido desoxirribonucléico

Gap – fenda

Overnight – período de tempo correspondente há uma noite

PCR – reação de polimerização em cadeia

Proliferating cell nuclear antigen - proteína com peso molecular de 29 kDa, sintetizada durante a fase S do ciclo celular

Real Time – PCR feito no tempo real

RNA – ácido ribonucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1 MELANÓCITOS.....	26
2.2 MELANINA.....	27
2.3 NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS.....	28
2.4 ETIOLOGIA.....	29
2.5 NEOPLASIA MELANOCÍTICA BENIGNA (MELANOCITOMA).....	31
2.6 NEOPLASIA MELANOCÍTICA MALIGNA (MELANOMA).....	32
2.6.1 Terminologia dos melanomas.....	32
2.6.2 Dados Clínicos e Epidemiológicos dos Melanomas.....	33
2.6.3 Achados Macroscópicos.....	35
2.6.4 Achados Microscópicos.....	35
2.6.5 Diagnósticos dos melanomas amelanicos.....	36
2.6.6 Outras análises histológicas.....	37
2.6.7 Prognóstico.....	37
2.6.8 Estadiamento Clínico (TNM).....	38
2.6.9 Tratamento.....	38
2.7 JUNÇÕES DO TIPO <i>GAP</i>	39
2.7.1 Estrutura das Junções Gap.....	40
2.7.2 Funções das Junções Tipo Gap.....	41
2.7.3 As Conexinas.....	42
2.7.4 Uma família de Conexinas.....	43
2.7.5 Conexinas e os Tecidos.....	40
2.7.6 Conexinas e a Permeabilidade.....	47
2.7.7 A Degradação das Conexinas.....	47
2.7.8 A Estrutura das Conexinas.....	48
2.7.9 Mutações das Conexinas.....	48
2.7.10 Conexina 26.....	49
2.7.11 Conexina 43.....	50
2.7.12 As Conexinas 26; 43 e o Melanoma.....	51
2.8 CADERINAS.....	51

2.8.1 As Caderinas e o Processo Tumoral.....	52
2.8.2 A Caderina-E.....	52
2.8.3 Caderina-E e o Melanoma.....	53
2.9 METALOPROTEINASES (MMPs).....	53
2.9.1 Metaloproteinases e o Processo Tumoral.....	54
2.9.2 MMP(s) 2; 9 e o Melanoma.....	55
2.10 A PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA).....	56
2.11 CASPASE 3.....	56
3 OBJETIVOS.....	58
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	58
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS DE MELANOMA.....	55
4.2 EXAMES CLÍNICOS E COMPLEMENTARES.....	60
4.3 TRATAMENTO.....	60
4.4 COLETA DOS TUMORES.....	61
4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	61
4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	62
4.7 TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	62
4.8 ANÁLISE QUALITATIVA DA CADERINA-E.....	64
4.9 ANÁLISE QUANTITATIVA DO PCNA.....	65
4.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÍNDICE MITÓTICO.....	65
4.11 ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS MMP2 E MMP9.....	66
4.12 ANÁLISE QUANTITATIVA – CASPASE 3.....	66
4.13 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF).....	67
4.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT (WB).....	67
4.15 TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL.....	68
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
5 RESULTADOS.....	71
5.1 ANIMAIS.....	71
5.2 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	72
5.3 ASPECTOS MACROSCÓPICOS.....	80
5.4 ASPECTOS MICROSCÓPICOS.....	76
5.5 INTENSIDADE DA MARCAÇÃO PARA CADERINA-E (IHQ).....	85

5.6 MARCAÇÃO E MORFOLOGIA PARA PCNA (IHQ).....	87
5.6.1 Análise Quantitativa - PCNA.....	88
5.7 ANÁLISE QUANTITATIVA – ÍNDICE MITÓTICO.....	89
5.8 MARCAÇÃO E MORFOLOGIA PARA CASPASE 3 PELA IMUNO- HISTOQUÍMICA.....	90
5.8.1 Análise Quantitativa – Caspase 3.....	90
5.9 ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO PARA MMP2.....	91
5.9.1 Análise Quantitativa - MMP2.....	92
5.10 ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO PARA MMP9.....	95
5.10.1 Análise Quantitativa – MMP9.....	95
5.11 MARCAÇÃO DAS CXS 26 E 43 EM EPITÉLIO NORMAL DE CÃES.....	99
5.11.1 Marcação e Localização da Cx26 pela Imunofluorescência.....	100
5.11.2 Marcação e Localização da Cx43 pela Imunofluorescência.....	102
5.12 WESTERN BLOT (WB).....	104
5.12.1 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 26 (Tipo Histológico).....	105
5.12.2 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 26 (Fenótipos).....	105
5.12.3 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 43 (Tipo Histológico).....	106
5.12.4 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 43 (Fenótipos).....	107
5.13 PCR EM TEMPO REAL.....	108
5.13.1 Quantificação da expressão gênica para Cx 26.....	108
5.13.2 Quantificação da expressão gênica para Cx 43.....	109
5.13.3 Quantificação da expressão gênica para MMP2.....	109
5.13.4 Quantificação da expressão gênica para MMP9.....	110
5.13.5 Quantificação da expressão gênica para Caderina-E.....	111
5 DISCUSSÃO.....	112
6 CONCLUSÃO.....	123
REFERÊNCIAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

Entre as especialidades da medicina veterinária que se destacam, encontra-se a oncologia (MACEWEEN et al., 2001), pois acredita-se que grande parte dos atendimentos realizados em hospitais veterinários, esteja relacionada aos tumores de maneira geral, que se localizam em diferentes partes do organismo. Esta perspectiva tem tornado os médicos veterinários ainda mais ansiosos e empenhados em encontrar maneiras de descobrir diferentes agentes anti-neoplásicos eficazes ao combate do câncer e principalmente, que os permitam crescer como pesquisadores.

Nas últimas décadas, o aumento da incidência dos casos de melanoma em cães tem motivado cada vez mais o estudo do seu perfil e prognóstico, onde muitas variáveis dentro do tumor parecem influenciar a sobrevida (FERREIRA et al., 1997).

A primeira análise clínico-patológica de critérios utilizados no diagnóstico e prognóstico dos melanomas foi realizada por Allen e Spitz (1953), citados por (SMOECKEL et al., 1983) e desde então muitos autores têm se preocupado em desenvolver estudos que permitam tornar o diagnóstico do melanoma mais preciso, nos animais domésticos, pois este tumor, carrega um grave prognóstico, principalmente quando detectado em estágios avançados, devido a impossibilidade de uma intervenção cirúrgica adequada.

Em cães, os melanomas são responsáveis por 7% de todos tumores malignos e geralmente encontram-se localizados na cavidade bucal e em região sublingual (SMITH e al., 2002). Os equinos, principalmente os tordilhos de pelagem acinzentada e pele pigmentada, também são comumente acometidos pelos melanomas. No entanto, em gatos atos o melanoma não é tão comum e geralmente apresenta um prognóstico reservado. De forma geral, somente 5% dos animais portadores de melanoma sobrevivem no período de cinco anos (SMITH et al., 2002).

Na espécie humana, o melanoma é o principal tumor maligno cutâneo e assim como nos cães, pode atingir a cavidade bucal, embora com menor frequência (de 1% a 2%), e quando ocorre traz maior risco aos pacientes (BARBOSA, 2010). Estima-se que o melanoma cutâneo represente 3% de todos os cânceres em seres humanos (FIGUEIREDO et al., 2003) e que para cada 75 pessoas nascidas a partir do ano 2000, uma desenvolverá o melanoma (AHIMEDI, 1997).

De acordo com a classificação utilizada na medicina veterinária, quanto ao seu aspecto morfológico, os melanomas são classificados, convencionalmente, em três subtipos

histológicos: epitelióide, fusiforme e misto. Há uma segunda classificação que concerne o fenótipo, ou seja, se baseia na síntese de melanina, a qual permite denominá-los de melânicos ou amelânicos. Ambas as classificações estão baseadas no último boletim da OMS (1998).

A compreensão das alterações moleculares, que ocorrem durante o desenvolvimento e progressão dos melanomas, é assunto de vários trabalhos recentes sobre a doença (BARBOSA, 2010). Baseado nesta premissa, esta tese teve como objetivos analisar certos aspectos moleculares destes neoplasmas, tais como o índice de proliferação celular e apoptose, a expressão dos canais de comunicação, principalmente as conexinas 26 e 43, as enzimas digestórias metaloproteínases 2 e 9, e de uma molécula de adesão denominada caderina-E. O estudo visou ainda compreender melhor a epidemiologia dos melanomas, que acometem a cavidade bucal de cães, levando-se em conta seus aspectos morfológicos e fenotípicos.

A grande finalidade de se estudar neoplasias em animais, é vislumbrar os melhores métodos e procedimentos de diagnóstico, de prognóstico e tratamento, além de se utilizar os resultados, como base para posteriores estudos em humanos, a fim de se compreender melhor o comportamento dos melanomas tanto nos animais domésticos, como no homem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão da tese, os tópicos descrevem desde as células normais, passando pela histologia e classificação dos melanomas, analisando o macro e microscópico, a epidemiologia e finalizando com a descrição de cada molécula estudada.

2.1 MELANÓCITOS

Em todos os vertebrados, a pele origina-se de um tegumento embrionário primário composto inicialmente por células da epiderme primitiva. Posteriormente ocorre à condensação de células mesenquimais, localizadas abaixo da epiderme e a pele primitiva passa a ser composta por duas camadas: a epiderme primitiva que dá origem a epiderme e uma camada mesenquimal, que origina a derme (PERRONE, 2001). Na epiderme é possível destacar quatro tipos celulares distintos: queratinócitos (85% das células observadas na pele); células de Langerhans (3 a 8%), células de Merckel (2%) e os melanócitos (5%) (MULLER et al., 2001), que serão amplamente discutidos.

Os melanócitos são células dendríticas (Figura 1A) derivadas dos melanoblastos neuroectodermis e da crista neural, que migram durante a embriogênese para a epiderme, derme, membranas mucosas e olhos (SMITH et al., 2002), através de um precursor denominado melanoblasto. A maior parte destas células situa-se na pele, mais especificamente na epiderme (entre a camada e lâmina basal) e entre os folículos pilosos, mas eles também podem serem encontrados na derme, ao redor de glândulas sebáceas e próximos aos ductos lactíferos, ou ao redor dos mamilos.

Uma vez que atingem a camada basal da epiderme, o melanócito estabelece uma relação simbiótica e de vizinhança com os queratinócitos. Para cada um melanócito, existem cinco queratinócitos ao seu redor (HSU et al., 2000; HAASS et al., 2005), e esta interação é mediada por dendritos que partem dos melanócitos e se estendem para dentro da epiderme, estabelecendo um tipo de comunicação (LI et al., 2002). Isto significa que em epidermes normais os melanócitos não estabelecem contato entre si, mas formam junções aderentes e regulatórias com os queratinócitos vizinhos, por meio das moléculas de adesão, tal como a caderina-E, a desmoglina e canais de comunicação do tipo *gap* (as conexinas) (Figura 1B).

Os melanócitos são células estáveis, que só proliferam em casos de regeneração ou injúria (BARNHILL et al., 1995), sendo o controle de sua regulação e proliferação realizado pelos queratinócitos, através de vias parácrinas, comunicações intra (via segundos mensageiros) e intercelular (via moléculas de adesão e conexinas), e sinais de transdução. Sob condições normais de homeostase, os melanócitos permanecem quiescentes, proliferam, se diferenciam ou sofrem apoptose (HAASS et al., 2005). Morfologicamente eles são compostos por um citoplasma pálido e abundante, com quantidades variáveis de pigmento, núcleos grandes, pleomórficos e nucléolos proeminentes. Sua principal função é sintetizar melanina, pigmento que confere cor aos pêlos, peles e cabelos, e protege a pele contra os raios solares.

Fonte: Haass et al., 2005.

Figura 1 - (A) Foto microscópica de melanócito na seta vermelha (Barra corresponde a objetiva de 100X em óleo de imersão). (B) Esquema representativo da homeostase melanócito-queratinócitos, através de diferentes moléculas de adesão e junções comunicantes

2.2 MELANINA

A palavra melanina tem origem no grego mélas e significa negro. Na realidade nem toda a melanina apresenta coloração enegrecida, sendo possível observar a eumelanina que apresenta coloração enegrecida e a feomelanina cuja cor é amarelada ou vermelha. Existe ainda a neuromelanina, considerada um subtipo da eumelanina que pode ser encontrada não somente na pele e pêlos, mas também no sistema nervoso, no epitélio pigmentar dos olhos, meninges e em vários núcleos cerebrais (PERRONE, 2001). A maior parte da melanina é encontrada na camada basal da epiderme, porém em cães de pele escura, este pigmento pode ser encontrado por todas as camadas da epiderme (MULLER et al., 2001). Deve-se ressaltar, que embora na vida embrionária a melanina seja produzida pela maior parte dos melanócitos,

após o nascimento, sua produção torna-se restrita aos melanócitos da epiderme e aos folículos pilosos.

A síntese de melanina se dá no interior dos melanossomas, organelas especializadas, com tirosinase ativa, que promovem a conversão da tirosina em melanina, no interior do Retículo Endoplasmático Granular (REG). Após ser sintetizada, a melanina permanece armazenada no Complexo de Golgi, sendo observada exclusivamente nos melanócitos. Os melanossomas se originam no aparelho de Golgi e constituem vesículas que atingem quatro estágios de desenvolvimento, sendo inicialmente denominados pré-melanossomas e a medida em que ocorre a síntese de melanina, tais estruturas passam a ser denominadas melanossomas. Quando a síntese de melanina se completa, o melanossoma recebe o nome de grânulos de melanina (BARNHILL et al., 1995). Uma vez que ocorre a síntese de melanina, ela não permanece retida no melanócito normal e sim nos melanossomas, podendo ser transferida aos queratinócitos, através dos seus dendritos, processo este denominado citocronia (CAMARGO, 2005).

A falta ou excesso de melanina no organismo pode acarretar em doenças de etiologias diferentes, manifestadas tanto no homem, como nos animais domésticos. Quando sua produção se dá em excesso, recebe o nome de hiperpigmentação, ao contrário, a sua escassez, recebe a denominação de hipopigmentação ou hipomelanose, que geralmente está atribuída a falta de melanócito (melanocitopênica) ou a redução de melanina (melanopênica).

2.3 NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

As neoplasias melanocíticas têm sido encontradas desde a antiguidade em indivíduos mumificados que viveram há mais de 2000 anos (CAMARGO, 2005), sendo chamadas de “melas” por Cesium. Em 1832, Dick ¹ (apud de ANTONY et al., 2006, p.755) apresentou o primeiro relato de um caso de melanoma em equino, atribuindo à lesão o nome de “doença melanocítica equina”. Em 1837, Carswell propôs o termo melanoma para tumores pigmentados maligno, e em 1864, Virchow classificou os melanomas de acordo com suas diferenças histológicas e quanto a hipomelanose. O primeiro relato de melanoma em cães foi realizado somente em 1882, por Bunker² (apud CAMARGO et al., 2008, p. 139).

1. Dick W. Melanosis in men and horses. Lancet 1832; 192(letter).

2. GARMA-AVIÑA, A.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. Cutaneous melanomas in domestic animals. Journal of Cutaneous Pathology, v. 8, p. 3-24, 1981.

O caminho pelo qual ocorre a conversão dos melanócitos normais em neoplásicos é um processo complexo, de pouco consenso, cujo início se dá durante a mutação gênica, ocasionando uma quebra da homeostase entre o queratinócito-melanócito, seguido pela promoção, transformação celular e metástase. Em humanos, 65% dos melanomas estão diretamente relacionados a mutação genética, associada a exposição crônica da radiação solar dos raios UVA e UVB (SMITH et al., 2002). Todavia, entre os animais domésticos ainda não se chegou a um consenso a este respeito, de qualquer forma, uma vez que os melanócitos adquirem sua autonomia, ou seja, conseguem escapar do controle dos queratinócitos, eles passam a se multiplicar de forma difusa, descontrolada e equivocada, levando a formação de tumores sólidos, que neste caso, podem assumir dois tipos de comportamento: benigno e maligno, sendo que em ambos os casos a patogenia parece ser à mesma.

Quando a neoplasia melanocítica é benigna, recebe a denominação Melanocitoma e do contrário, quando a lesão é maligna, recebe o nome de Melanoma ou Melanoma Maligno, de acordo com o último boletim da OMS (1998) para medicina veterinária (GOLDSCHMIDT et al., 1998). Esta diferenciação só pode ser estabelecida através de um exame histológico criterioso, pois algumas vezes o patologista fica sujeito a equívocos devido a semelhança entre eles. Os dados morfológicos devem ser corroborados ao histórico do animal, o tempo de evolução tumoral, ao aspecto macroscópico, a localização da lesão, entre outros, a fim de minimizar os erros e concluir um falso diagnóstico.

2.4 ETIOLOGIA

Em animais, assim como em seres humanos, o problema da etiologia das lesões melanocíticas parece ainda permanecer no estágios das teorias e suposições, com controvérsias e afirmações que subsequentemente são questionadas parcialmente ou totalmente. Para medicina veterinária, a raça, consangüinidade, entre outros fatores desencadeantes, seja eles um trauma, ou exposições química e solar, hormônios ou a susceptibilidade genética, possivelmente resultem no aumento do número de casos e das mutações celulares (SMITH et al., 2002). O fator hereditário parece ser possível entre algumas espécies de animais, tais como cavalos e porcos.

Acredita-se que os melanomas oriundos da mucosa bucal se desenvolvam a partir de uma reação hiperplásica epitelial, decorrente de injúria crônica, seja ela de natureza mecânica

ou inflamatória. Este fato resulta na quebra da interação dos melanócitos com os queratinócitos, gerando a amplificação de uma reação celular espontânea. Outros fatores ambientais não identificados também podem exercer um papel crucial neste contexto (SMITH et al., 2002). Interessante, que as lesões melanocíticas parecem se desenvolver preferencialmente em áreas pigmentadas.

Estudos fundamentados nas bases moleculares, em carcinogênese, têm se orientado em algumas direções, tais como a ativação de oncogênes, análise citogenética das anormalidades cromossômicas e pesquisas dos genes, que levam a proliferação desenfreada do melanócito. Estudos com células de melanoma humano, têm verificado que elas apresentam baixos níveis de mutação na proteína p53 (relacionada à apoptose), sendo mais comum as mutações nos genes *INK4a*, *INK4b*, que codificam as proteínas p15 e p16 (inibidoras da ciclina kinase dependente CDK1) e *Waf-1* (codificadora da proteína p21, outro CDK1). Outras mutações dos genes *INK4a*, que também codificam a proteína p19 (ativador da p53) e *INK4b*, fazem com que não se tenha eficácia na inibição da mitose, permitindo assim um crescimento celular desenfreado. Isto significa que a atividade de um importante supressor tumoral, tal como a p53, parece ser sabotada na maioria dos melanomas, por caminhos indiretos e não convencionais.

Outros estudos têm demonstrado que os melanomas apresentam elevadas concentrações de quatro fatores angiogênicos: a Angiogenina; Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF); Fator Básico de Crescimento de Fibroblasto (β FGF) e Interleucina 8 (IL-8), correlacionando-nos à progressão tumoral e ao maior período de sobrevivência. Alguns estudos têm trabalhado com hipóteses que avaliam as possíveis vias por onde as células melanocíticas tumorais escapam ao controle dos queratinócitos, podendo ser elas: (1) baixa regulação dos receptores para caderina-E e conexinas, importantes na comunicação com os queratinócitos; (2) alta regulação de receptores e moléculas sinalizadoras, tais como a caderina-N e molécula de adesão Mel-CAM, que embora não sejam encontradas nos melanócitos, são importantes para a interação melanoma-melanoma e melanoma-fibroblasto, e finalmente a terceira via, perda da ancoragem da membrana basal, através das integrinas (HAASS et al., 2005).

Existem ainda pesquisas, que evidenciaram disfunções e mutações na sinalização regulatória, através da proteína quinase ativada pelo mitógeno (MAPK), que regula o crescimento, invasão celular e angiogênese (BARBOSA, 2010). Além disso, melanomas com mutações entre os genes RAS-RAF-MEK-MAPK ou PI3K-AKT e entre os receptores da

tirosinase ERBB4 ou c-KIT (DAVIES; SAMUELS, 2010), demonstraram um fenótipo mais agressivo.

Mutações de proto-oncogenes em oncogenes, que incluem c-myc; c-erb-B-2; c-yes, c-kit e ras, também foram responsáveis pela proliferação e desenvolvimento tumoral. Em humanos os melanomas podem se desenvolver a partir de uma lesão displásica pré-existente, mas este fato não parece ser viável entre os animais. O desenvolvimento do melanoma parece estar ligado a uma instabilidade cromossomal, ou a predisposição genética dos melanócitos, a proliferação e mutação, ocasionada pelos fatores estimulantes já mencionados.

2.5 NEOPLASIA MELANOCÍTICA BENIGNA (MELANOCITOMA)

O termo melanocitoma passou a ser atribuído a todas as proliferações de melanócitos benignos, de caráter não congênito, em todas as espécies consideradas (GROSS et al., 1992). São lesões relativamente comuns em cães, cavalos e algumas raças de suínos, sendo raro nas demais espécies (PERRONE, 2001).

Macroscopicamente, são caracterizados por nódulos únicos, circunscritos, não encapsulados, de coloração enegrecida e alopecicos, mensurando entre 1 e 4 cm de diâmetro e raramente apresentam-se ulcerados. Eles mantêm predileção pela pele, mais especificamente em região de cabeça, tronco, pálpebra e focinho (GROSS et al., 1992). Microscopicamente, estes tumores são caracterizados pela junção de pequenas células arredondas ou poligonais, restritas a camada basal da epiderme, que em algumas situações chegam a formar ninhos. Por vezes têm se observado graus variados de anaplasia, o que caracteriza um sinal de malignidade.

De acordo com o tipo da morfologia celular e sua localização os melanocitomas são subdivididos em: Melanocitoma: originados na região da epiderme e anexos e são subclassificados em Dérmicos, Compostos e Intraepidérmicos. Entre os melanocitomas mais raros destacam-se o Melanocitoma de Células de Balão, compostos por células arredondadas gigantes e o Melanoacantoma, tumores que apresentam características de um melanocitoma composto e de uma neoplasia epitelial benigna.

O termo “nevus”, comumente utilizado pela patologia humana para se referir aos melanocitomas não é utilizado na medicina veterinária, o que torna seu uso inapropriado na literatura veterinária (GOLDSCHMIDT et al., 1998).

2.6 NEOPLASIA MELANOCÍTICA MALIGNA (MELANOMA)

Foi na década de 1920, que os melanomas começaram a ganhar notoriedade, com Darier ³ (1925) (apud de MARQUES et al., 2010, p. 324) que utilizou pela primeira vez o termo “melanosarcoma”, após encontrar grande similaridade entre as lesões de animais e a de humanos. Após vários anos, Mihm et al. (1971) propuseram o termo “melanoma maligno” às lesões melanocíticas pigmentadas. No decorrer dos anos, verificou-se que estas lesões apresentavam morfologia celular diferenciada, e muito embora, atualmente exista um padrão histológico padronizado, ainda não está claro se esta diferença morfológica exerce influência no grau de malignidade. Correlações entre as características histológicas e o comportamento biológico dos melanomas, oferecem diversas perspectivas e pouco consenso (SPANGLER; KASS, 2006).

Desde a década de vinte, os estudos com melanomas vêm ganhando força a cada ano, haja visto, um significativo aumento do número de diagnósticos e trabalhos publicados na área. Apesar das óbvias diferenças biológicas e anatômicas, que distinguem o homem dos cães, vários dados científicos e epidemiológicos da medicina têm auxiliado aos médicos veterinários através de propostas e sugestões que têm sido feitas no caso do melanoma canino (SPANGLER; KASS, 2006).

2.6.1 Terminologia dos Melanomas

Há alguns anos o termo “melanoma” tem sido empregado na nomenclatura veterinária, e algumas classificações têm sido utilizadas tanto para as neoplasias melanocíticas benignas, como já fora explicado, quanto às malignas (GOLDSCHMIDT; SHOFR, 1992). Contudo, embora a OMS ainda utilize o termo “melanoma maligno” (GOLDSCHMIDT et al., 1998), esta denominação tem gerado discordância entre alguns autores (SMITH et al., 2002; SPANGLER; KAASS, 2006) e tem caído em desuso. Baseado nesta premissa, o autor da tese adotou o termo melanoma para se referir as neoplasias melanocíticas malignas.

3 - Darier J. Le melanome malin mesenchymateux ou melano-sarcome. Bull Assoc Fr Cancer 1925;14:221-249

3.6.1 Dados Clínicos e Epidemiológicos dos Melanomas

Melanomas são neoplasias malignas relativamente comum em cães, oriundos da disfunção de células denominadas melanócitos (Figura 2), que podem acometer qualquer região do corpo. Entre suas principais localizações destacam-se a cavidade bucal (cerca de 56%), seguido por lábios (23%), pele (11%), dígitos (8%), olhos e testículos (2%) (SMITH et al., 2002; BERGMAN et al., 2007). Na pele, os melanomas são responsáveis por 5% de todos os tumores (SMITH et al., 2002), sendo os cães de pele pigmentada os mais acometidos. Todavia, ainda não existem estudos que comprovem a predileção por raças específicas. A maioria dos cães que desenvolve a doença apresenta idade superior a 10 anos, mas a faixa etária pode variar entre 1 a 17 anos, com maior acometimento de machos (SMITH et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2010).

Fonte: <saude-joni.blogspot.com>

Figura 2 – Desenho esquemático que representa as camadas da pele e evidencia um quadro de desenvolvimento de melanoma

No caso dos melanomas, tanto o prognóstico, quanto os sinais clínicos baseiam-se na localização tumoral. Uma vez que atingem o inter-dígito a chance de ocorrer metástase aumenta em 58% e a sobrevivência do animal pode chegar até 12 meses após procedimento cirúrgico (MARINO, 1995). Na cavidade bucal, o grau de malignidade pode intensificar em até 90% (MELEO, 1997), sendo a disfagia, halitose, pitalismo e ocasionalmente fratura de mandíbula, devido a intensa osteólise local, os sintomas mais comuns. Em região ocular, geralmente na úvea anterior, o melanoma pode desencadear dor intermitente e cegueira. Na

pele, os sintomas costumam ser assintomáticos e com prognóstico mais favorável, sendo observado alteração do tamanho, cor da lesão e eventualmente alopecia. A localização passa a ser um fator importante e interessante, pois 90% das lesões melanocíticas observadas na mucosa bucal são malignas, enquanto que a maioria das lesões observadas na pele, tem melhor prognóstico, com exceção aos tumores localizados nos inter-dígitos, que tendem ao comportamento maligno (MELEO, 1997).

Os melanomas são tumores que apresentam um crescimento rápido, cuja sua forma de invasão sob o tecido pode ocorrer sob dois aspectos distintos: uma invasão radial, o que significa extensão lateral da lesão (mais comum em humanos) e outra forma de invasão, denominada vertical, cujo crescimento se dá em região de epiderme e derme, podendo se exteriorizar (Figura 3), este é o caso mais frequente nos cães e intensifica a possibilidade de ocorrer metástase. As duas vias possíveis de metástase são a linfática e hematogena, tendo como alvo principal os linfonodos regionais (70% dos pacientes desenvolvem metástase) e como segundo alvo e menos frequente o pulmão (SMITH et al., 2002). De acordo com os dados estatísticos, 28% dos pacientes com melanoma, desenvolvem metástase precocemente em órgãos distantes, levando ao pior prognóstico, no entanto, até o presente momento ainda não existem estudos capazes de compreender os mecanismos pelos quais alguns melanomas acometem primeiramente aos linfonodos regionais ou órgãos distantes (ZYBTEK et al., 2008). Quando se faz o diagnóstico de melanoma, através de citologia aspirativa prévia, ou biópsias incisionais e excisionais, o passo seguinte é estabelecer o estadiamento clínico do paciente, o que inclui uma pesquisa de metástase pelos exames físicos e complementares, tais como Radiografia de tórax, Ultra-som de abdome, Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética conforme critério do médico veterinário.

Foto cedida pelo Dr. Marcelo Rangel Monte-Mór

Figura 3 - Foto macroscópica de um melanoma em região de maxila de cão. É possível visualizar o crescimento vertical com exteriorização do tumor (círculo amarelo)

3.6.2 Achados Macroscópicos

Os melanomas podem apresentar tonalidades diferentes de cores que variam entre castanho, avermelhado, cinza e preto. A pigmentação não é uma característica única dos melanomas, pois outras lesões neoplásicas e não neoplásicas podem se manifestar através de um fenótipo similar. Seu tamanho pode variar entre 1 e 10cm de comprimento, formados por bordas irregulares, achatadas e em placas, com superfície irregular e assimétrica. Podem ser encontrados sob forma de nódulos únicos ou múltiplos (Figura 4A), pedunculados ou sésseis. Geralmente apresentam consistência firme, são hemorrágicos e ulcerados (Figura 4B), devido ao rápido crescimento.

Figura 4 - (A) Foto macroscópica de lesões múltiplas de melanoma em pele de cão (B) Foto macroscópica de melanoma em mandíbula de cães. Lesão hemorrágica, ulcerada e de consistência firme

3.6.3 Achados Microscópicos

De acordo com a localização histológica e sua morfologia celular, os melanomas podem ser subdivididos entre 3 tipos diferentes (baseado no último boletim médico veterinário da OMS de 1998): Melanomas Epitelióides: compostos por células arredondadas que se localizam nas camadas da epiderme, com bordas discretas e arredondadas, citoplasma abundante e vítreo, núcleo largo e nucléolo proeminente. Geralmente se localizam em região de epiderme ou membrana basal. Melanomas Fusiformes: constituído por células alongadas

ou em forma de fuso, que se unem formando ondas e feixes na região mesenquimal, com estroma escasso e algumas vezes em forma de ninho (GOLDSCHMIDT et al., 1994). Geralmente se localizam em região da derme, sendo similares as células de fibrossarcomas, com núcleos largos e nucléolos proeminentes. Melanomas Mistos: recebe esta denominação pelo fato de envolver os dois tipos celulares e localizações mencionadas.

Uma segunda classificação que se baseia no fenótipo é atribuída aos melanomas: Melanomas Melânicos ou Pigmentados: neste caso ocorre síntese de grande quantidade de melanina e Melanomas Amelânicos ou Amelanocíticos: melanoma não produz ou sintetiza baixas quantidades de melanina e neste caso deve-se ter como diagnósticos diferenciais outros tumores, com morfologia semelhante. Os melanomas amelânicos são capazes de mimetizar outras neoplasias, podendo confundir o patologista e tornar o diagnóstico dificultoso. Baseado nesta premissa, justifica-se além dos dados clínicos e da avaliação anatomopatológica, o uso de marcadores específicos pela técnica de imuno-histoquímica.

3.6.4 Diagnósticos dos melanomas amelânicos

Os melanomas amelânicos devem ser diferenciados de outros tumores tais como os fibrossarcomas, tumores de bainha neural periférica maligno, carcinomas anaplásicos e carcinomas de glândulas sebáceas (BERRINGTON et al., 1994). Em alguns casos, os critérios histológicos não se mostram capazes de estabelecer um diagnóstico certo, o que torna necessário a utilização de outros recursos, principalmente o uso de marcadores imuno-histoquímicos. Após o estudo de literaturas consagradas, foi preconizado o seguinte perfil imuno-histoquímico, para diagnóstico de melanoma amelânico: Vimentina: filamento típico de células mesenquimatosas e derivados, como melanomas e neoplasias não epiteliais. Embora seja um marcador altamente sensível, apresenta baixa especificidade, mas tem sido útil na marcação de melanomas amelânicos quando associada a outros marcadores. Enolase neuro-específica (NSE): marcador de origem neural, importante na marcação de melanócitos, devido a origem neuro ectodérmica da mesma. Embora não seja um marcador específico têm auxiliado na diferenciação dos melanócitos e outros tumores. Proteína S-100: está presente em praticamente todas as lesões de melanócitos em humanos, e com grande variedade em células não melanocíticas, tais como células glia, neurônios e células de schwann

(RAMOS VARA et al., 2000). HMB45: este marcador é um anticorpo monoclonal que reage diretamente com tumores melanocíticos, é específico e sensível aos melanomas. Melan-A: considerado um marcador altamente específico e sensível para tumores melanocíticos.

3.6.5 Outras análises histológicas

Além da análise morfológica, o exame anatomo-patológico deve levar em consideração o grau de pleomorfismo celular, a quantidade de infiltrado inflamatório, a atipia celular, o número de mitose e a ulceração, ou seja, ausência de epiderme intacta sobre uma porção significativa do tumor primário (BALCH, 1980), pois a presença destes componentes pode estar associada ao grau de malignidade (PERRONE, 2001). Para Clemente (1996), o infiltrado inflamatório tumoral, cuja presença representa a resposta imune do hospedeiro às células do melanoma (JUNG, 2008), é o único parâmetro de prognóstico significativo em análise multivariada, no entanto, deve estar associado à espessura do tumor.

É importante ressaltar que em se tratando da análise histológica dos melanomas, na medicina veterinária, os padrões de prognóstico dos pacientes ainda não estão bem definidos e não seguem os mesmos padrões utilizados pela medicina, tais como análise da espessura tumoral (em mm), propostos por Clark (1969) e Breslow (1970) e análise do infiltrado inflamatório.

2.6.7 Prognóstico

Como já fora mencionado, a medicina veterinária, diferentemente da medicina, não compartilha do mesmo tipo de análise ao que se refere aos fatores anatomopatológicos de prognóstico, propostos pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC). Os médicos patologistas se utilizam de dois importantes fatores, que são o índice de Breslow e o nível de Clark, que avaliam a espessura e localização anatômica do melanoma, a fim de definir o prognóstico dos pacientes. Na medicina veterinária, o prognóstico dos pacientes é definido

somente pela análise do estadiamento clínico (TNM). O que se também vislumbrou através da análise dos tipos morfológicos e fenótipos dos melanomas, foi de futuramente se estabelecer uma possível forma de prognóstico.

2.6.8 Estadiamento Clínico (TNM)

Cães que desenvolvem melanoma primário em cavidade bucal, apresentam um prognóstico reservado (BERGMAN, 2007), e embora nos dias de hoje, esta premissa seja de conhecimento dos oncologistas, o entendimento do prognóstico só foi possível após a criação de uma classificação elaborada pela OMS, que leva em consideração os dados obtidos por meio de avaliações clínicas e por diagnósticos não invasivos realizados antes do tratamento.

Esta classificação propõe a análise da disseminação anatômica sob três aspectos diferentes: (T): Tumor primário, caracterizado pela extensão da neoplasia no local primário e envolvimento de estruturas adjacentes; (N): Linfonodos Regionais e (M): Metástase a distância (DALECK; DE NARDI; RODASKI, 2009). Estes elementos serviram de base para traçar os perfis dos tumores entre os pacientes estudados, permitindo estabelecer a diferença de prognóstico e gravidade.

2.6.9 Tratamento

Primeiramente, há de se deixar claro que até o fechamento deste estudo, ainda não havia se evidenciado um tratamento eficaz ou capaz de conter o avanço do melanoma. Assim sendo, é importante combatê-lo com as armas disponíveis e que pareçam surtir melhores prognósticos. Dentre os tratamentos, destacam-se a excisão cirúrgica com obtenção de margem de segurança, associada aos tratamentos adjuvantes, muito embora a instituição de quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e criocirurgia pareçam ser de benefício mínimo, trabalhos atuais não compactuam de tal afirmação (QUEIROZ et al., 2004).

Quando o melanoma acomete a cara do paciente, a mandibulectomia parcial ou total ou a maxilectomia parcial ou total parece dar uma sobrevida ao animal de até 10 meses, sem a associação de qualquer terapia adjuvante. No entanto, quando se opta por um procedimento

cirúrgico conservativo, sem adição de tratamento adjuvante, a recidiva pode ocorrer em até 70% dos casos, com média de sobrevida de 3 a 4 meses (PROULX et al., 2002). Baseado nesta premissa é importante verificar a possibilidade de uma intervenção cirúrgica adequada sem se preocupar com a estética do paciente.

A Carboplatina, utilizada como monoterapia adjuvante, parece surtir algum efeito entre 10 a 20% dos casos. No entanto, uma resposta satisfatória pode ser obtida somente em 2% dos animais tratados, o que pode significar uma sobrevida de no máximo 9 meses. E em 13% dos casos, os pacientes sobrevivem até dois anos (PROULX et al., 2002). A poliquimioterapia utilizada no tratamento dos melanomas, tem associado a Cisplatina, Vimblastina e Dacarbazina, todavia, independentemente das drogas escolhidas e da estratégia traçada, os resultados ainda permanecem insatisfatórios e desconhecidos. Nas últimas décadas, têm ocorrido uma revolução no tratamento contra o câncer, tratamentos estes que têm se baseado no bloqueio de moléculas alvo, principalmente com o uso de inibidores de Metaloproteinase 2, c-KIT e VEGF, o uso de proteínas anti-apoptóticas e da gene-terapia.

2.7 JUNÇÕES DO TIPO *GAP*

Os canais intercelulares de junção do tipo *gap* (CIJG) foram descritos pela primeira vez na década de 60 por Kanno e Loewenstein (1964), que utilizaram o termo “junção comunicante do tipo *gap*” com a finalidade de descrever regiões especializadas nas membranas plasmáticas de duas células adjacentes, que se reaproximam sem se fundirem, delimitando um espaço entre duas membranas ou *gap* estimado em 2 - 3 nm, em relação aos 15 - 20 nm, que separam duas células vizinhas. Goodenough et al. (1972) e Makowski et al. (1977) isolando as junções *gap* de hepatócitos de camundongos, pelo método de cristalografia e difração de Raio – X, observaram imagens por difração óptica efetuadas sobre as frações de membranas ricas em CIJG, revelando que estas membranas são formadas por estruturas hexaméricas chamadas de *conexons* com 7 nm de diâmetro. Foi então proposto pelos autores um modelo de placa juncional, também chamada de junções *gap*, que são formadas pela reunião de um extenso número de *conexons*, cuja extensão é proporcional ao número desses canais.

Cada *conexon* é constituído por seis subunidades protéicas, chamadas *conexinas* (Cx), que atravessam a membrana plasmática e quando oligomerizadas formam um poro central hidrofílico de cerca de 2 nm de diâmetro (Figura 5). O tamanho e o número de placas

juncionais variam muito de um tipo celular para outro e dependem frequentemente do estado de atividade dos tecidos (DERMIETZEL et al., 1990; BEYER, 1993).

Fonte: <lab.univ-poitiers.fr/ipbc/FR/ICC/def-cxine.htm>.

Figura 5 – Modelo de organização da placa juncional

2.7.1 Estrutura das Junções Gap

Como já fora mencionado, as Cxs oligomerizadas em *conexons*, se associam a outro *conexon* fornecido pela célula adjacente formando uma simetria exata e um canal juncional completo. Cada canal é composto pela associação de 12 moléculas de Cxs ao redor de um poro central (MAKOWSKI et al., 1977; UNGER et al., 1999), que permanece inserido na bicamada lipídica da membrana plasmática de cada célula adjacente. Isto significa que cada membrana plasmática fornece um *conexon* formado por 6 conexinas, portanto, as junções *gap* são formadas por 12 conexinas e 2 *conexons*.

Uma das principais contribuições no transcorrer dos últimos anos foi à demonstração de que diferentes conexinas podem estar implicadas na formação de um mesmo canal. E neste caso, cada *connexon* pode ser classificado como homomérico, quando composto por um único tipo de conexina ou heteromérico quando apresenta mais de um tipo de conexina na sua composição. Por sua vez, os canais intercelulares podem ser constituídos a partir de combinações diferentes de *conexons* homoméricos e/ou heteroméricos. A associação de dois *conexons* idênticos leva a formação de um canal homotípico, enquanto que o alinhamento de

dois *conexons* diferentes forma um canal heterotípico (Figura 6).

A existência de *conexons* heteroméricos foi observada *in vitro* e confirmada *in vivo* (AVANZO, 2005). Diferentes combinações foram descritas, tais como as Cx 32 e Cx 26 no fígado (DIEZ et al., 1999), na glândula mamária (BERTHOUD et al., 2000) e na epiderme de humanos (EVANS; MARTINS, 2002).

Fonte: (GILULA; KUMAR; et al., 1996).

Figura 6 - Desenho esquematizado dos possíveis arranjos dos *conexons* nos canais de CIJG

2.7.2 Funções das Junções Tipo Gap

Além de atuarem de forma direta no desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular (KOJIMA et al., 2002), os CIJG permitem a harmonização e sincronização das atividades celulares, desempenhando importante função na regulação da homeostasia tecidual e na manutenção das constantes fisiológicas (pH e concentrações iônicas). Isto ocorre devido ao rápido transporte de pequenas moléculas célula a célula, sendo responsáveis pelo fluxo direto de moléculas com peso molecular inferior a 1000–2000 dâtons, sendo elas: íons K^+ , Cl^- e mensageiros secundários (IP3, AMPc e Ca^{2+}), nucleotídeos (ADP, ATP e CTP) e determinados compostos do metabolismo intermediário, como os aminoácidos (YAMASAKI; NAUS, 1990; KUMAR; GILULA, 1996; YAMASAKI, 1996).

Nas células excitáveis, os CIJG são responsáveis pela troca de íons, possibilitando a sincronização das atividades elétricas. Por exemplo, nos cardiomiócitos eles permitem a sincronização dos batimentos cardíacos, nos neurônios asseguram a coordenação da resposta

aos estímulos centrais, tornando a comunicação via junções *gap* no SNC mais rápida do que aquelas fornecidas pelas sinapses químicas (AVANZO, 2005). Na pele, entre os queratinócitos, são importantes para proliferação, diferenciação e homeostase, funcionando também como barreira protetora e sendo responsáveis por recrutar células inflamatórias quando necessário (DJALILIAN et al., 2006). Além de participarem da nutrição de órgãos pobremente vascularizados, tal como o cristalino (GOODENOUGH et al., 1980) e da diluição de compostos tóxicos no fígado (AVANZO, 2005).

2.7.3 As Conexinas

Estudos realizados sobre suas estruturas moleculares, por meio de técnicas de bioquímica, a partir de frações subcelulares ricas em junções tipo *gap*, mostraram que a extração destas frações a partir do tecido, só foi possível graças à relativa resistência destas placas juncionais à solubilização por determinados detergentes (N- Laurilsarcosina; Triton -X 100) ou por compostos alcalinos, como o hidróxido de sódio (HERTZBERG, 1984). Sendo assim foi possível descobrir que as conexinas são proteínas transmembranares não glicosadas, com massa molecular variando entre 21 a 70 kDa.

A primeira conexina a ser identificada e caracterizada foi a Cx 32, em fígado de rato. Após a obtenção da seqüência de aminoácidos da extremidade aminoterminal da proteína pelo método de degradação de Edman, os oligonucleotídeos foram sintetizados e serviram como sondas para produzir bancos de cDNA (fita de ácido desoxirribonucleico complementar a ácido ribonucleico que contém a mensagem que codifica para determinada proteína) de diferentes tecidos (HEYNKES et al., 1986). Beyer et al. (1987) fundamentados nos primeiros relatos da conexina 32 em fígado de rato, clonaram o cDNA correspondente às proteínas das Cx 43 e Cx 46 do coração e sugeriram o nome de conexina 43 ou Cx 43 em associação ao seu peso molecular (kDa). Enquanto inicialmente as conexinas foram classificadas de acordo com sua origem tecidual, tornou-se claro que esta denominação não era adequada, pois a mesma conexina poderia se expressar em vários tecidos. Na tentativa de padronizar esses achados, outras nomenclaturas que se utilizadas atualmente foram propostas.

2.7.4 Uma família de Conexinas

Estudos envolvendo RNA mensageiros e conexinas revelaram que elas são codificadas nos mamíferos por uma família multigênica, constituída por pelo menos 21 membros (GOODENOUGH et al., 1996). O cDNA que codifica as conexinas revelou regiões com alta, pouca ou nenhuma homologia, permitindo assim uma classificação através da utilização de números correspondentes aos seus pesos moleculares, tais como: Cx 26, Cx 30.3, Cx 31, Cx 31.1, Cx 33, Cx 32, Cx 37, Cx 40, Cx 43, Cx 45, Cx 46, Cx 50, Cx 60 (YAMASAKI; NAUS, 1996) (Quadro 1). Nos casos em que as conexinas apresentaram massas moleculares muito próximas, utilizou-se um número decimal, tais como as Cx 31 e Cx 31.1 (HENNEMANN et al., 1992). Em se tratando de conexinas homólogas, ou seja, de mesma formação estrutural e entre espécies diferentes, utiliza-se um sufixo, caracterizado por uma abreviação que determina a espécie, é o caso do humano como, por exemplo, Cx h.

Existe ainda outra nomenclatura alternativa que se baseia na análise filogenética das diferentes conexinas, isto é, nas homologias sequenciais de nucleotídeos, propondo que os genes das conexinas originem-se de uma sequência ainda indeterminada, e que teria sofrido ao menos uma duplicação no início ou imediatamente antes da evolução dos vertebrados, dando origem à separação entre as subclasses α , β e γ (GILULA; KUMAR, 1992). Nesta nomenclatura, cada Cx é nomeada pela classe na qual ela aparece, identificada por uma letra grega (α , β ...), seguido do número da ordem de sua identificação. Por exemplo, a Cx32 aparece na classe β , pois foi a primeira Cx identificada nesta classe e portanto, é identificada como β 1 (PAUL et al., 1986). O Quadro 1 relaciona as duas nomenclaturas, os pesos moleculares das conexinas e suas localizações nos diferentes órgãos e tecidos.

Todas as conexinas descobertas são codificadas por genes diferentes localizados em cromossomos distintos, exemplo, o gene Cx 32h (no humano) está localizado no cromossomo X, o da Cx 43h no cromossomo 6, a Cx 26h no cromossomo 13 (WILLECKE et al., 1990).

Classe de Cx	Nomenclatura do peso molecular	Massa Molecular (kDa)	Órgãos onde se expressam
α 1	Cx 43	43.0	Coração
α 2	Cx 38	37.8	Embrião
α 3	Cx 46	46.0	Retina
α 4	Cx 37	37.6	Pulmão
α 5	Cx 40	40.4	Pulmão
α 6	Cx 45	45.7	Coração
α 7	Cx 33	32.9	Testículo
α 8	Cx 50	49.6	Retina
β 1	Cx 32	32.0	Fígado
β 2	Cx 26	26.5	Fígado
β 3	Cx 31	31.0	Pele
β 4	Cx 31.1	31.1	Pele
β 5	Cx 30.3	30.3	Pele

Fonte: GILULA; KUMAR 1996.

Quadro 1 – Nomenclaturas mais utilizadas das conexinas e suas localizações. Relação entre as duas nomenclaturas propostas para identificação das conexinas, baseada na análise filogenética das diferentes Cxs, utilizando-se letras gregas seguida de um número e/ou de acordo com o peso molecular de cada proteína

2.7.5 Conexinas e os Tecidos

As conexinas estão distribuídas entre os diferentes tecidos de maneira muito complexa e extensa (Quadro 2). Com exceção das células musculares estriadas adultas, dos espermatozoides e das células sanguíneas, todos os tecidos expressam uma ou várias conexinas. Todavia uma mesma Cx pode ser encontrada em vários tecidos ou tipos celulares, é o caso da Cx 43 (Quadro 3). Já ao contrário de outras, como as Cx 33, Cx44 e Cx 31.1 que apresentam um padrão mais restrito.

Quando várias conexinas são co-expressas, elas podem se combinar fazendo parte de uma mesma placa juncional, é caso das Cxs 26 e 32, encontradas nos hepatócitos de camundongos (GUERRIER et al., 1995). Esta multiplicidade e especificidade na expressão das conexinas, associadas à diversidade dos tipos celulares que compõem um dado tecido, dificultam a determinação exata da função da comunicação intercelular de cada conexina expressa no tecido. Em um mesmo órgão, como o fígado, as conexinas podem se distribuir de maneira muito particular, por exemplo, os hepatócitos expressam predominantemente a

conexina 32 em ácinos (PIECHOCKI et al., 1999) e a conexina 26, em menor quantidade, tem sido encontrada somente em hepatócitos peri-portais. Já as células epiteliais biliares expressam grande quantidade de Cx 43 e baixas quantidades de Cxs 26 e 32. No coração, a Cx 40 está localizada nas fibras de *Purkinge*, enquanto que a Cx 43 encontra-se predominantemente no miocárdio ventricular e esta incompatibilidade entre as duas proteínas é o que permite o perfeito funcionamento do batimento cardíaco (BRUZZONE et al., 1993). Lerner et al. (2000) sugeriram que em camundongos Cx 43 +/-, ocorre apenas 50% dos níveis normais de expressão da conexina 43 na musculatura cardíaca.

No epitélio normal a conexina 43 tem sido encontrada nas camadas mais superficiais da pele, e a conexina 26 sendo encontrada em regiões mais específicas do folículo piloso.

Conexina	Classe	Tecido	Tipo Celular
Cx 26	β 2	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro, pâncreas, pele, pineal	Hepatócito, neurônio, queratinócito, pinealócito
Cx 30	β 6	Pulmão, estômago, útero, pele	Queratinócitos
Cx 30.3	β 5	Pele	Queratinócitos
Cx 31	β 1	Pele e testículos	Queratinócitos
Cx 31.1	β 4	Epitélio estratificado escamoso, pele e testículo	Queratinócitos
Cx 32	β 1	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro e útero	Hepatócito, oligodendrócito, neurônio, célula de Schawann, células epiteliais da tireóide
Cx 33	α 7	Testículo	Células de Sertoli
Cx 36		Retina, cérebro	Neurônios
Cx 37	α 4	Fígado, rim, baço, testículos, pulmão, estômago, intestino, cérebro e útero, ovário, vasculatura e coração	Células endoteliais e fibras de Purkinge
Cx 40	α 5	Vasculatura, coração, rim, útero, ovário, pulmão e intestino	Células endoteliais e fibra de Purkinge
Cx 43	α 1	Pele, córnea, rins, tireóide, cristalino, ovários, hipófise anterior, pâncreas, bile	Blastócitos, fibroblastos, macrófagos
Cx 44		Retina	
Cx 45	α 6	Pulmão, cérebro, rim, pele, coração, intestino	Cristalino, célula de Schawann
Cx 46	α 3	Cristalino, coração, rim e nervo periférico	Cristalino, célula de Schawann
Cx 50	α 8	Cristalino, córnea, coração	Cristalino, células epiteliais, valvas atrioventriculares
Cx 57	α 9	Ovários, pele, coração, testículos, intestinos	Enterócitos, Sertoli
Cx 60		Ovários, cólon; timo; baço	Ovarianos e hematopoéticos

Fonte: AVANZO, 2005.

Quadro 2 – Distribuição tecidual das conexinas nos mamíferos

Órgãos	Conexinas	Referências
Hipófise	Cx 43; Cx 26	Meda P., et al., (1993) e Morand I. et al., (1995)
Paratireóide	Cx 43; Cx 26	Meda P., et al., (1993)
Pâncreas Endócrino	Cx 43	Meda P., et al., (1991)
Glândulas Adrenais	Cx 43	Meda P., et al., (1993) e Murray S. A., et al., (1995)
Tireóide	Cx 43; Cx 32	Meda P., et al., (1993) e Munari-Silem Y., et al., (1994)
Ovário	Cx 43; Cx 37; Cx 40	Haefliger J. H. et al., (1992) e Schreiber J. R. Et al., (1993)

Fonte: MUNARI-SILEM et al., 1994.

Quadro 3 – Distribuição das conexinas nas glândulas endócrinas

2.7.6 Conexinas e a Permeabilidade

Os CIJG apresentam uma permeabilidade diferenciada, de acordo com os tipos de conexinas que formam, no entanto, o grau de permeabilidade pode mudar durante a diferenciação celular, conforme a necessidade do equilíbrio fisiológico celular. Isto ocorre por exemplo com as células ovas que se diferenciam em CEB (células epiteliais biliares) e neste caso ocorre alteração da expressão das Cx 43 e 26 para 31 e 31.1 (BRISSETTE et al., 1994). Paralelamente a esta diferenciação, ocorrem mudanças na permeabilidade das CIJG, que deixa de transmitir moléculas de qualquer peso molecular, permitindo somente a passagem de moléculas com baixo peso molecular.

Um estudo mais recente demonstrou que a seletividade e permeabilidade independem da condução do canal (VEENSTRA et al., 1995), entretanto, a base molecular para essa aparente seletividade permanece desconhecida. Tornou-se evidente, portanto, que a permeabilidade depende do tamanho, da forma e da carga das moléculas trocadas (ELFGANG et al., 1995).

2.7.7 A Degradação das Conexinas

As conexinas apresentam sobrevida média que varia entre 1h e 30 min a 5 horas, conforme o tipo de conexina e o tipo celular considerado, com exceção da Cx 46 que apresenta média de vida superior a 24 horas (JIANG et al., 1993).

2.7.8 A Estrutura das Conexinas

A sequência de aminoácidos derivados de cada cDNA, tem sido utilizado para estabelecer a estrutura das moléculas de conexina, que compartilham uma topologia comum (SAEZ et al., 2003). As conexinas estão associadas à membrana plasmática por múltiplas α hélices trans-membranares, através de 4 domínios hidrofóbicos, representado cada um, por segmento transmembrana M1, M2, M3 e M4 e ligados por hélices citoplasmáticas (com cerca de 40 a 60 aminoácidos) e 3 alças hidrofílicas, com cerca de 20 a 30 aminoácidos. As alças extracelulares, E1 e E3 são responsáveis pela acoplagem dos *conexons*, que ocorre através da colisão entre dois *conexons*, cada um proveniente de uma célula adjacente, enquanto que a alça hidrofílica citoplasmática E2 é responsável pelo fechamento do canal e sinalização intracelular (CHIPMAN et al., 2002). A estrutura das conexinas é composta ainda por duas extremidades, uma delas aminoterminal e a outra carboxiterminal (Figura 7).

Fonte: <herkules.oulu.fi/.../html/i1002636.html>.

Figura 7 – Topologia da molécula de conexina

2.7.9 Mutações das Conexinas

Até os dias de hoje se desconhece o real impacto de alterações nos genes das conexinas sobre os indivíduos, entretanto, a identificação de doenças genéticas, nos fornece evidências de que a comunicação via CIJG é crucial para o desenvolvimento e funcionamento de numerosos órgãos (AVANZO, 2005). Alterações nestes canais podem ser as causas de várias anomalias (Quadro 4), pois algumas evidências e numerosos estudos têm sido realizados com a finalidade de elucidar a relação entre junções intercelulares do tipo *gap* e o

crescimento celular (RUCH; TROSKO, 1998; YAMASAKI et al., 1999).

Diversos trabalhos têm demonstrado que quando algumas células são expostas a fatores de crescimento e aos promotores tumorais (condições em que há um aumento da proliferação celular), a capacidade de comunicação via *gap*, e a expressão das conexinas encontram-se reduzidas (GUAN et al., 1995). Além disso, a maioria das células neoplásicas apresenta níveis alterados de expressão protéica e uma redução na capacidade de comunicação por CJIG (YAMASAKI et al., 1999).

Gene da Conexina	Doença genética no homem	Referências
Cx 32	Forma ligada ao cromossomo X de <i>Charcot Marie – Tooth</i>	BERGOFFEN et al., 1993
Cx 26	Surdez neuro-sensorial não sindrômica; Queratoderma palmoplantar	KELSELL et al., 1997
Cx 31	Eritroqueratodermia variabilis; Distúrbios da audição	RICHARD et al., 1998 Xia et al., 1998
Cx 50	Catarata zonular pulverulenta	Shiels et al. 1998

Quadro 4 – Doenças genéticas relacionadas às mutações das conexinas

2.7.10 Conexina 26

A Conexina 26 é apenas uma das oito proteínas da família que se encontra expressa, de maneira fraca na camada granulosa da epiderme de camundongos (KRETZ et al., 2004), afirmação que corrobora com Haass et al. (2010), que não a localizaram em todas as camadas do epitélio. No entanto, é pode-se afirmar que após uma injúria, ou cicatrização ocorra um aumento na sua expressão. Fortes evidências têm sugerido que a Cx26 exerça um importante papel na diferenciação epidermal em pacientes humanos (DJALILIAN et al., 2006). O mesmo autor ainda faz referência a outros estudos que demonstraram pela técnica de imuno-histoquímica, que a mesma proteína não é encontrada em pele normal, mas sim em queratinócitos de pacientes com psoríases.

Mutações no gene da conexina 26 têm acarretado em cinco desordens distintas da pele em humanos (DJALILIAN et al., 2006), o que permite afirmar que sua baixa expressão em epitélios normais é essencial para a diferenciação epitelial. A mutação do gene da conexina 26 não se restringe apenas as lesões de pele, mas também a problemas relacionados à audição (KELSELL et al., 1997) e desenvolvimento tumoral. De acordo com Haass et al. (2006) as

Cx 26h e Cx 30h têm sido identificadas em queratinócitos derivados de células tumorais, em nódulos superficiais, carcinomas infiltrativos de células basais, carcinomas de células escamosas, queratoses seborréicas, actínicas e verrugas. Além disso, tem se tornado evidente a relação entre Cx 26 e os melanócitos que compõem o órgão vestibular do ouvido humano (MASUDA et al., 1996). Haja vista que esta proteína esteja presente em diversos tecidos humanos, tais como cérebro, fígado, rim e esôfago, podendo também ser encontrada entre os melanócitos subepiteliais (MASUDA et al., 2001).

2.7.11 Conexina 43

A Cx 43 dentro da família das proteínas, é a mais abundante entre os tecidos e está amplamente distribuída por quase todos os órgãos dos mamíferos. Na camada epitelial dos camundongos, ela está localizada principalmente entre a camada basal e supra-basal da camada espinhosa (KRETZ et al., 2004). No entanto, de acordo com Haass et al. (2010) esta proteína está localizada em todas as camadas da epiderme de humanos.

Ela também exerce uma importante função no miocárdio ventricular (SÁEZ et al., 2003), pois sua expressão tem sido relacionada ao bom funcionamento e homeostasia do organismo. Todavia, a diminuição na sua expressão, seja em humanos ou em animais, têm sido associada à isquemia e infarto. Estudos têm evidenciado que animais homozigotos com deleção em ambos os alelos (Cx 43 -/-) morrem ao nascerem, devido à má formação ventricular (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2000).

Pesquisas com pâncreas *in vitro* têm sugerido que a Cx 43 exerça um importante papel sobre as células endócrinas e exócrinas, sendo necessária para a produção de insulina (SÁEZ et al., 2003). No útero, esta conexina é abundantemente encontrada entre as células miométricas, sugerindo sua participação na regulação da atividade uterina. A mesma ainda encontra-se presente na camada elástica das grandes e pequenas artérias musculares, porém ainda não está totalmente clara sua função na angiogênese.

2.7.12 As Conexinas 26; 43 e o Melanoma

A Cx 26 tem sido observada formando ninhos principalmente ao redor de células endoteliais de melanomas humanos primários e secundários (SAITO-KATSURAGI et al., 2007), além serem encontradas em queratinócitos das camadas supra-basais da epiderme inter-folicular adjacente ao melanoma primário (HAASS et al., 2005) e no citoplasma de células de melanomas em estágio avançado (ITO et al., 2000). Haass et al. (2010) verificaram aumento de sua expressão em todas as camadas epiteliais dos melanomas ulcerados.

Estudos, que tem implantado a Cx43 (Cx 43+/+) em linhas de células *knockouts* (Cx43 +/-) têm diminuído a possibilidade das células de melanomas se aderirem, independentemente do crescimento, levando a formação de colônias eficientes, e este fato tem sugerido que a Cx 43 exerça um importante papel na supressão tumoral de melanomas (SU et al., 2000). Tem sido ainda observado, através de cultura celular, que os melanócitos e os melanomas são capazes de sintetizar a Cx43 (HSU et al., 2000). Baseado nestas premissas têm se tornado claro a importância biológica das conexinas no desenvolvimento do melanoma.

2.8 CADERINAS

As caderinas constituem uma super família de glicoproteínas transmembranares que formam moléculas de adesão cálcio-dependentes e são mediadas por interações homofílicas. Desde a descrição do primeiro membro desta super família até hoje, 80 glicoproteínas têm sido relatadas entre vertebrados e invertebrados (PEINADO et al., 2004). Estes membros são organizados em subfamílias de acordo sua estrutura e organização funcional. Deste modo, podem-se considerar cinco diferentes tipos de subfamílias: as Caderinas Clássicas; Caderinas tipo II; os Desmossomos; as Protocaderinas e finalmente as Caderinas (NOLLET et al., 2000). Entre as Caderinas Clássicas, destacam-se a Caderina-E (Epitelial), a Caderina-P (Placental) e Caderina-N (Neural), sendo que todas exercem um importante papel na adesão entre as células epiteliais.

2.8.1 As Caderinas e o Processo Tumoral

A perfeita adesão intercelular é responsável por manter a morfogênese epitelial e a homeostase, entretanto, a perda ou qualquer alteração desta aderência pode contribuir para diferenciação de células epiteliais em neoplasias e desencadear as metástases (TORRES et al., 2005). Nos últimos anos, além da expressão das conexinas, outras moléculas de adesão, principalmente as caderinas, têm sido alvo de muitos estudos, ao que se refere sua participação durante a progressão tumoral. Entre o seletivo grupo de caderinas tem-se como principal destaque a caderina-E (PEINADO et al., 2004).

A adesão e a comunicação celular não devem ser entendidas como fenômenos estáticos ou como efeitos limitados à função de "cimento" intercelular. É importante ressaltar mais uma vez, que as moléculas envolvidas nesses processos, além de estarem envolvidas com a ligação e comunicação, mas também permitem a transmissão de sinais reguladores e a troca de informações entre as células. Assim sendo, esta interação, permite às células organizarem-se em grupos e formarem estruturas complexas, bem como a participarem da organogênese e reconstrução tissular. Portanto, quaisquer distúrbios na interação celular normal podem ocorrer pela baixa produção de junções *gap* e pela falta das moléculas de adesão, ou por um bloqueio em suas ações, gerando novas interações celulares e a disseminação das células fora do seu sítio original. Esses eventos poderiam explicar uma ou mais etapas no processo de carcinogênese (LEME et al., 2005).

2.8.2 A Caderina-E

A Caderina-E é a maior glicoproteína transmembrana, e considerada a maior molécula de adesão entre melanócitos intra-epidermais e os queratinócitos (TUCCI et al., 2007). Sua principal função é mediar a interação entre as células adjacentes, e entre as células e Matriz-Extracelular, mantendo assim a integridade do tecido epitelial (DENADAI et al., 2006). Em epidermes normais ela está expressa principalmente entre as junções aderentes, formando assim uma “cola” entre os melanócitos e queratinócitos, estabelecendo a homeostasia intercelular (HSU et al., 2000).

As caderinas-E conectam-se ao citoesqueleto através de proteínas com domínios

citoplasmáticos chamados cateninas, de aproximadamente 92 kDa. Duas cateninas principais, as β -cateninas que se ligam a região citoplasmática da caderina-E e as α -cateninas estão diretamente associadas à actina do citoesqueleto. Na ausência das cateninas, a caderina-E não consegue exercer sua eficácia sobre a adesão celular (JOHNSON, 1999).

2.8.3 Caderina-E e o Melanoma

Em epidermes normais, a caderina-E está localizada nas bordas intercelulares entre os queratinócitos e melanócitos (TANG et al., 1998), e sua perda pode estar relacionada à progressão do melanoma. Este processo parece ser um dos passos responsáveis pelo foco tumoral primário (HIROHASHI, 1998).

Durante o desenvolvimento do melanoma primário, tem se relacionado a perda progressiva da molécula de caderina-E (LI et al., 2002), e este processo de evolução tumoral não se relaciona exclusivamente à perda da adesão física, mas a múltiplos eventos que levam a proliferação celular famigerada (GUILFORD et al., 1999). Esta incontrolável proliferação, associado ao desarranjo celular, a diferenciação morfológica, invasão e por último a metastáse, são características que devem ser atribuídas a alterações na adesão e comunicação entre as células normais e neoplásicas, fatores ainda desconhecidos (PARK et al., 2000). Acredita-se que as células dos melanomas escapem ao controle dos queratinócitos, devido a baixa regulação de receptores importantes para adesão da Caderina-E (HAASS et al., 2005).

2.9 METALOPROTEINASES (MMPs)

As MMPs são enzimas constituídas por uma família de endopeptidases com atividade hidrolítica de amplo espectro entre as proteínas extra-celulares (REISS, 2002), e que pertencem a uma família de pelo menos 20 membros, produto de genes homólogos ou pseudo-homólogos, relacionados entre si (WOESSNER et al., 1991). Estas enzimas são classificadas de acordo com critérios estruturais e funcionais, em quatro grandes famílias de diferentes especificidades de substrato: Colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), Gelatinases (MMP2 e MMP9), Estromalisinas (MMP3, MMP7, MMP10, MMP11 e MMP26) e

Metaloproteínas de Membrana (MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 e MMP25) (SHINGLETON et al., 1996) .

Todas as MMPs têm características em comum, que incluem um domínio catalítico que acomoda um átomo de Zinco⁺² no sítio ativo; um domínio peptídico essencial para a manutenção de sua latência enzimática que é removido quando a enzima é ativada (SHIMA et al., 1992) e um domínio translacional peptídeo sinal, que direciona o produto da secreção. A maioria das MMPs possui um domínio C-terminal, com uma sequência de homologia e hemopexina, que constitui um sítio de ligação para os inibidores teciduais (REISS, 2002). Já as gelatinases A e B (MMP 2 e 9), diferem das demais por apresentarem um domínio semelhante ao FN, separando o domínio catalítico do semelhante à hemopexin. A gelatinase B, possui ainda um domínio semelhante ao colágeno. Todas as MMPs requerem um pH neutro e Cálcio para atuarem e são inibidas por uma família específica de proteínas, denominadas inibidores tissulares de MMP (TIMP) (NGUYEN et al., 2001).

As MMPs estão amplamente distribuídas no organismo humano, onde desempenham uma série de funções fisiológicas, como a cicatrização (WOLF et al., 2002), a reabsorção óssea, involução mamária, além de serem consideradas enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação e remodelação da matriz extra-celular e vascularização (LOUKOPOLOS et al., 2003). Recentemente, tem-se demonstrado que as MMPs estão associadas a diversos processos patológicos, principalmente à invasão tumoral e à metástases, em modelos experimentais de carcinogênese. Suas atividades são reguladas por expressão gênica, ativação de uma pró-enzima e por inativação da enzima ativa, via inibidores tissulares específicos. A expressão destas proteínas é induzida por fatores de crescimento, célula-célula e célula-matriz.

2.9.1. Metaloproteinases e o Processo Tumoral

Nos últimos anos, tem-se estudado a relação entre as MMPs e os vários estágios da progressão do câncer (NIKKOLA et al., 2005). A fisiopatologia destas enzimas durante o processo tumoral, bem como seu potencial metastático, têm despertado grande interesse na investigação clínica, já que o processo de invasão tumoral inicia-se a partir da degradação de elementos da matriz extracelular e do estroma intersticial, tais como: colágeno, laminina, fibronectina, tenascina, gelatinas e proteoglicanos (LIOTTA et al., 1991). Entende-se que as MMPs ampliem o processo de invasão tumoral, não apenas pela degradação proteica da

matriz extra-celular (MEC), mas pela ativação de cascatas de transdução de sinal que promovem motilidade e solubilização dos fatores de crescimento ligados à MEC (MCCAWLEY; MATRISIAN, 2001). Os diferentes tipos de metaloproteinases estão expressos nos mais variados estágios durante a progressão do câncer, principalmente em se tratando das gelatinases MMP2 (72 kDa) e MMP9 (92 kDa), reponsáveis pela regulação da angiogênese e metástases, através de diferentes mecanismos (NIKKOLA et al., 2005), que ainda permanecem desconhecidos.

2.9.2 MMP(s) 2; 9 e o Melanoma

Como já fora abordado anteriormente, estas enzimas têm sido associadas a invasão e a metástase, entretanto, as MMP2 e 9 pertencentes a classe das gelatinases têm a capacidade de degradar o colágeno tipo IV, principal componente da lâmina basal, sendo este um fator relevante na capacidade invasiva das neoplasias malignas (RIBEIRO et al., 2008).

Os melanomas apresentam células agressivas, que por sua vez, expressam alta concentração de MMP2 e MMP9 (SCHNAEKER et al., 2004). Estudos com melanomas altamente invasivos e melanomas *in situ*, têm demonstrado, pela imunohistoquímica para MMP2 e MMP9, marcações variadas. A MMP2 foi observada em 14 dos 18 melanomas invasivos, e 13 dos 18 melanomas invasivos foram positivos para MMP9 (SIMONETTI et al., 2002). De fato alguns inibidores sintéticos de Metaloproteinases têm sido desenvolvidos recentemente como drogas anti-tumorais, sendo que alguns deles demonstraram redução de metástase em melanomas *in vitro* (SCHNAEKER et al., 2004).

Em estudo com *coort* elevado, Wollina et al. (2001) verificaram alta concentração de MMP2 em pacientes com melanoma metastático, quando comparado aos pacientes com melanoma localizado. De acordo com Loukopoulos et al. (2003) a participação das MMPs 2 e 9 em tumores caninos é evidente, pois as mesmas são relacionadas aos estágios da patogênese e no avanço clínico de vários tumores.

2.10 A PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)

O antígeno da Proliferação Celular Nuclear ou *PCNA* (*Proliferation Cell Nuclear Antigen*) é uma proteína DNA polimerase, com 36 kDa, composta por 261 aminoácidos nucleares, presentes nas células quando há replicação ou síntese de DNA. É uma proteína sintetizada no núcleo e sendo observada, principalmente durante a fase tardia G1, aumentando durante a fase S e diminuindo durante as fases G2 e M (BRAVA; CELIS, 1980), estando correlacionada à proliferação celular. Além disso, suas principais funções têm sido atribuídas ao reparo e duplicação do DNA, devido a sua participação na montagem de cromatina e também na transcrição de RNA.

Nos melanomas, o PCNA é sintetizado no citoplasma e transportado para o núcleo durante a fase S (IYENGAR, 1994), sendo sua marcação realizada principalmente durante a fase G1, e permanecendo forte durante as fases G2 e M do ciclo celular (PEÑA et al., 1998).

A quantidade de PCNA no tumor, tem utilizada como um significativo prognóstico em carcinoma gástrico (WOOSLEY; DETRICH, 1993). Hoje a mesma assertiva pode ser aplicada a outras neoplasias, principalmente ao melanoma, pois tem se relacionado o PCNA ao grau de malignidade em neoplasias humanas (HOFFMAN et al., 1993).

2.11 CASPASE 3

As caspases são um grupo de proteases que possuem um resíduo de cisteína, capaz de clivar outras proteínas, após um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre as proteases. O nome "caspase" é derivado dessa função molecular característica: *cysteine-aspartic-acid-proteases*. Estas enzimas são essenciais para que se ocorra a apoptose celular, um dos principais tipos de morte celular programado, durante o desenvolvimento e em outras fases da vida adulta. Algumas caspases também são necessárias ao sistema imune, para a maturação das citocinas.

Existem dois tipos de caspases: caspases iniciadoras e caspases efetoras. As caspases iniciadoras (por exemplo caspase-8, caspase-9) clivam pro-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as; caspases efetoras (por exemplo caspase-3, caspase-7) por sua vez clivam outros substratos protéicos da célula resultando no processo apoptótico. A iniciação da

reação em cascata é regulada por inibidores de caspases. Onze caspases já foram identificadas em humanos.

Os mecanismos da apoptose podem estar envolvidos na gênese de neoplasias, sendo descrita a expressão anômala de algumas destas proteínas em melanomas. No entanto, qualquer falha que tenha ocorrido durante o processo de apoptose, é uma das principais contribuições ao desenvolvimento de diversos tumores.

3 OBJETIVOS

Este item foi dividido de acordo com o seu tema principal e os meios pelos quais eles foram alcançados.

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os melanomas melânicos e amelanicos da cavidade e bucal de cães, caracterizando-os quanto a aspectos epidemiológicos, morfológicas (epitelióide, fusiforme e misto) e moleculares.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar a epidemiologia dos melanomas da cavidade bucal de cães, particularmente quanto à sobrevida dos animais entre os tipos melânicos e amelanicos.

Comparar as variáveis morfológicas e fenotípicas quanto à proliferação celular, analisada por meio da determinação do índice mitótico e da positividade para PCNA.

Comparar as variantes morfológicas e fenotípicas, quanto à apoptose, analisada por meio da positividade para Caspase-3.

Comparar as variantes morfológicas e fenotípicas, quanto à expressão das conexinas 26, 43, caderina-E e metaloproteinases (MMPs) 2 e 9, utilizando as técnicas de Imuno-histoquímica, Imunofluorescência, Western blot e PCR em Tempo Real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este item refere-se detalhadamente aos procedimentos e técnicas utilizados durante a pesquisa. Os itens seguem a cronologia conforme os experimentos foram sendo realizados.

4.1 ANIMAIS E AMOSTRAS DE MELANOMA

Amostras de melanomas da cavidade bucal foram obtidas de cães atendidos no Laboratório de Odontologia Comparada, Serviço de Cirurgia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Não foi feita distinção entre gênero, raça, idade dos pacientes e peso em kilo gramas (kg).

O autor da tese era avisado previamente sobre as datas dos procedimentos cirúrgicos e no momento da cirurgia, tinha acesso ao histórico clínico dos pacientes. Não era realizada citologia aspirativa prévia, portanto, qualquer tumor da cavidade bucal fora coletado, sendo posteriormente diagnosticado por meio de exame histopatológico. Quando se traçava o diagnóstico de melanoma, os casos eram incluídos no trabalho; outros tipos de tumores, no entanto, foram catologados e tiveram suas amostras armazenadas em freezer -80°C para estudos futuros e composição de um banco de tumores. A estratégia cirúrgica e quaisquer condutas tomadas à respeito dos pacientes couberam aos pós-graduandos e residentes que fizeram o atendimento, não havendo participação direta do autor do trabalho.

A fim de se correlacionar o perfil dos melanomas quanto ao fenótipo, tipo histológico e prognóstico, o histórico dos pacientes contendo todas as informações do animal e do tumor eram anotados no momento do procedimento cirúrgico. Denominou-se “tempo de evolução tumoral”, ao período em que o proprietário do animal informava ao médico veterinário à quanto tempo havia tomado conhecimento do tumor.

Após o processo cirúrgico, os animais foram acompanhados, até sua morte, ou através do prontuário ou pelos serviços prestados pelos pós-graduandos, tal como o “grupo da dor”, que chegou a atender alguns animais, a fim de se estabelecer o prazo de recidiva da neoplasia e prognóstico dos pacientes.

4.2 EXAMES CLÍNICOS E COMPLEMENTARES

Todos os pacientes foram submetidos a exames complementares tais como Radiografias de tórax e cabeça, exame de sangue (hemograma completo) e Tomografia Computadorizada da cabeça, a fim de se pesquisar metástase, estabelecer a TNM e verificar a gravidade da invasão óssea. Os linfonodos regionais também eram submetidos à análise clínica prévia e retirados em casos de infarto ou aumento. Em dois casos, optou-se após a autorização prévia do proprietário, pela eutanásia do paciente, pois os mesmos apresentavam um quadro avançado da doença, tais como: metástases em linfonodos e pulmão, importante infiltração tumoral com lise óssea acentuada, dificuldade para deglutir e sofrimento físico evidente. Os animais eutanasiados e os que morreram horas após o procedimento cirúrgico não foram incluídos na análise da curva de sobrevida.

4.3 TRATAMENTO

Embora nos dias de hoje, as neoplasias bucais ofereçam muitas opções de tratamento, entre elas a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, hipertenia e terapia dinâmica, a excisão cirúrgica radical ainda é a medida de eleição, pois tem demonstrado um maior índice de sucesso entre tumores malignos desta natureza (MARCONATO et al., 2008). Qualquer procedimento cirúrgico oncológico visa à obtenção de margens livres do tumor, ou seja, margens com no mínimo 2 cm de diâmetro. Muitas vezes para que isto seja possível, há necessidade de se recorrer a osteotomia, principalmente no caso da cavidade bucal, onde a hemi-maxilectomia e hemi-mandibulectomia, maximizam a remoção de todo componente ósseo e do processo neoplásico (MARCONATO et al., 2008). Dessa forma, a cirurgia fez parte integral do plano terapêutico, especialmente em se tratando de melanomas, pois este é o procedimento que oferece a maior possibilidade de cura, embora algumas vezes não se preserve a função óssea ou não se obtenha a estética aceitável. Ressalta-se ainda que margens de segurança extensas e procedimentos mais radicais foram realizados após o resultado da biópsia. Nenhum animal recebeu qualquer tipo de tratamento neo ou adjuvante, seja ele quimioterápico ou não, no controle do melanoma.

4.4 COLETA DOS TUMORES

Durante o tempo de estudo, foram obtidas 25 amostras de melanomas provenientes da cavidade bucal de cães, entre machos e fêmeas, de raças variadas. Foram coletados fragmentos do tecido que representavam o tumor, sendo realizados dois cortes transversais e dois horizontais de aproximadamente 2 cm cada. O corte geralmente era feito de cima para baixo (na posição vertical) abrangendo as camadas mais superficiais da pele (epiderme) e derme. Procurou-se evitar os fragmentos com evidências macroscópicas de infecção, com pús, necrose e ulceração, a fim de se evitar a coleta de tecidos comprometidos. Uma pequena porção do fragmento tumoral era armazenado em nitrogênio líquido e posteriormente transferido ao freezer – 80°C para realização das técnicas moleculares, conforme detalhado nos itens seguintes, e outra parte da amostra, contemplando cortes com 4 mm foi fixada imediatamente em formol. Após 48 horas em que a amostra permanecia fixada, a mesma era destinada ao Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ/USP para confecção das lâminas, fossem coradas por H.E. e lâminas silanizadas para análise imuno-histoquímica e imunofluorescência. Todas as suspeitas de melanomas amelanicos foram confirmadas através da utilização da técnica de imuno-histoquímica com anticorpos pré-estabelecidos.

4.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Os tumores ainda no local de origem, ou seja, em contato com o tecido, foram classificados em: exofíticos ou vegetantes, pedunculados, sésseis e vilosos. O termo “tumores ulcerativos” aplicou-se aos melanomas que apresentavam extensas áreas de necrose e úlcera, purulentas, fossem elas hemorrágicas ou limpas.

Após a ressecção total das neoplasias, as mesmas eram delineadas quanto ao seu tamanho, o que era obtido através da mensuração do comprimento *vs* diâmetro e simetria (dividindo a lesão na sua porção central por um eixo imaginário vertical, as duas metades devem ser muito semelhantes). Este critério foi bastante difundido e aceito, tendo, inclusive sido considerado, no trabalho de Stolz um dos três mais importantes para o diagnóstico de melanoma (VERONESE; MARQUES, 2004).

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Após confecção das lâminas os tumores eram diagnosticados de acordo com os três tipos histológicos e/ou fenótipo. Um grande índice de desacordo entre os patologistas experientes em tumores melanocíticos é fato bastante conhecido e discutido na literatura mundial (VERONESE; MARQUES, 2004). Portanto as lâminas foram revisadas por dois patologistas do Departamento de Patologia, que se basearam no último boletim da OMS para veterinária (1998) para classificar histologicamente os tumores. Para tanto foi utilizado o microscópio Eclipse E-800 (Nikon Tokio – Japão).

Embora alguns autores e patologistas ainda utilizem o termo “melanoma maligno”, o autor da tese optou por utilizar neste trabalho, o termo “melanoma”, conforme a maioria dos autores utiliza e uma vez que a neoplasia melanocítica benigna recebe a denominação melanocitoma.

Durante o estudo e análise anatomo-patológica dos melanomas, algumas importantes considerações foram feitas, tais como: se a lesão melanocítica estava delimitada e circunscrita, ou seja, se as células lesionais intra-epidérmicas das bordas laterais estavam predominantemente dispostas em ninhos. E as características de malignidade foram avaliadas, conforme as áreas de necrose e úlceras, presença ou não de infiltrado inflamatório, situado ao redor de vasos do plexo superficial, presença de plasmócitos e neutrófilos, a atipia celular, ou seja, o tamanho e a forma da célula, do núcleo e nucléolo, presença de mitose, seja na derme superficial ou profunda, fosse ela atípica ou não.

4.7 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IHQ)

Desde 1914 quando Coons e colaboradores revolucionaram a patologia com a identificação de antígenos teciduais, com métodos de imunofluorescência direta (COONS et al., 1941), a imuno-histoquímica vem sido utilizada como uma importante ferramenta molecular na investigação do diagnóstico histológico e na pesquisa, durante a marcação celular. Não obstante, o advento desta técnica permite elucidar o diagnóstico em casos de tumores pobremente diferenciados, e principalmente na identificação da histogênese

dos tumores melanocíticos amelanicos. Para tanto, em se tratando do diagnóstico certo dos amelanicos, utilizou-se um perfil imuno-histoquímico já consagrado por outros autores e muito utilizado na medicina veterinária. Foram utilizados 5 marcadores que excluam quaisquer tipos de dúvida, tais como: Anticorpo anti-vimentina (*Dako Corporation rabbit polyclonal – 1:100*); Anticorpo anti- proteína S100 (*Dako Corporation rabbit polyclonal – 1:80*); anticorpo anti-enolase (Santa Cruz Biotechnology, Inc – *goat polyclonal – 1:100*) e marcadores para antígeno melanocítico, HMB45 (*mouse monoclonal antibody melanoma Ab-3 – Dako – 1:50*) e anticorpo anti-Melan A (*mouse monoclonal anti-marti-1, Dako – 1:25*).

Não apenas para identificação dos melanomas amelanicos, a mesma técnica foi utilizada para marcação de outras importantes moléculas e proteínas, através da utilização do anticorpo para caderina-E (*Dako Corporation monoclonal mouse anti human - 1:100*), para análise do PCNA, utilizou-se o anticorpo específico Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (*PCNA Clone PC10 – 1:100 DAKO*), para Caspase – 3, (anti-human Cell Signaling, para MMP2 (anti-human - 1:25 Sigma) tendo reação cruzada para cães e MMP9 (*polyclonal rabbit anti-human – 1:40 Dako*); Cx 26 (*anti-mouse – Invitrogen 1:100*) e Cx 43 (*anti-rabbit Zymed 1: 100*) (Quadro 5).

A técnica de imuno-histoquímica seguiu a metodologia descrita por Hsu (1981), com modificações. Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em sequência de álcoois (absoluto, 95% e 70%) e água destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação (30 min), em solução contendo 80% de álcool metílico e 20% de peróxido de hidrogênio 30 volumes. As lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C, com anticorpo primário. Após este período, as lâminas eram lavadas em PBS por 3 vezes e incubadas com o anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulinas de camundongos durante o período de 2 horas, em temperatura ambiente. Seguiu-se a incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente e a revelação com solução contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina. No entanto, devido a alta presença de melanina, entre os melanomas amelanicos, o que dificultava a visualização das células, as lâminas sofreram um processo de despigmentação através de um pré-tratamento com Permanganato de Potássio (KMNO₄) e Ácido Oxálico (AO) conforme metodologia descrita por Sulaimon et al. (2002). Após o desmascaramento com tampão Citrato, as lâminas eram mergulhadas em Permanganato de Potássio por 30 minutos, posteriormente lavado em PBS

por cinco minutos três vezes e mergulhado em Ácido Oxálico por 1 minuto. Feito isto, segue-se normalmente o procedimento de imuno-histoquímica ou imunofluorescência.

Anticorpo Primário	Concentração	Período de Incubação	Referência Comercial
Monoclonal – mouse - anti-human HMB45	1:25	Overnight 4°C	Dako®
Monoclonal mouse anti-human Melan-A	1:25	Overnight 4°C	Dako®
Anticorpo monoclonal mouse E-Cadherin	1:100	Overnight 4°C	Dako®
Anticorpo produzido em coelho MMP2	1:25	Overnight 4°C	Sigma®
Policlonal rabbit anti-human MMMP9	1:80	Overnight 4°C	Dako®
Mouse Monoclonal Vimentina	1:50	Overnight 4°C	Dako®
Policlonal – Rabbit S-100	1:100	Overnight 4°C	Dako®
Goat – Polyclonal Enolase	1:100	Overnight 4°C	Dako®
Monoclonal – Mouse PCNA	1:100	Overnight 4°C	Dako®
Ceaved Caspase - ASP175	1:100	Overnight 4°C	Cell Signaling®
Cx 26 – Anti-Mouse	1:100	Overnight 4°C	Invitrogen®
Cx 43 – Anti-Rabbit	1:100	Overnight 4°C	Zymed®

Quadro 5 – Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica para identificação de melanomas e pesquisa

4.8 ANÁLISE QUALITATIVA DA CADERINA-E

Para avaliar a diferença da imuno-marcação para a caderina-E entre a morfologia e o fenótipo, elaborou-se um grau de marcação que se baseou na interpretação subjetiva, da reação da caderina-E pela imuno-histoquímica, através de uma análise qualitativa, porém consagrado por outros autores em diferentes tumores (FUKUMARU, K. 2007). Para tanto, foi

observada a presença e ausência de caderina-E nos tecidos, através da coloração acastanhada (revelação por DAB) em região de membrana plasmática ou localização aberrante (citoplasmática) por se tratar de um tecido tumoral. Para cada amostra analisada, foram contabilizados aproximadamente 20 campos histológicos, em objetiva de grande aumento (objetiva 40X), pelo programa de software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002, câmera Nikon 800.

Baseado na intensidade da marcação, o grau de intensificação foi representado por um número de cruces que variou de uma a três, ou seja, marcação fraca: uma cruz (+); marcação moderada: duas cruces (++) e marcação forte: três cruces (+++). Este tipo de avaliação tumoral sempre fora comparado à marcação epitelial íntegra a fim de se comprovar que houve marcação do tecido e utilizado como controle positivo.

4.9 ANÁLISE QUANTITATIVA DO PCNA

Para avaliação da imuno-marcação para PCNA foi observada a presença ou ausência de coloração acastanhada nuclear, pela técnica de imuno-histoquímica e revelação por DAB, nas células neoplásicas entre as células tumorais. Para cada amostra, foram quantificadas 3000 células imuno-marcadas (PCNA) em objetiva de 20X, o que correspondeu a aproximadamente 20 campos histológicos. O mesmo programa de software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002, fora utilizado. A proporção entre as células marcadas foi transformada em valores percentuais e o cálculo estatístico foi realizado somente com as células positivas para PCNA.

4.10 ANÁLISE QUANTITATIVA DO ÍNDICE MITÓTICO

Para cada amostra do tecido, foram quantificadas o número de células em mitose dentro o total de 1000 células contabilizadas, em lâminas coradas por HE, utilizando objetiva de (40X) em aproximadamente 10 campos histológicos. Para tanto foi utilizado o programa de software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição

2002. A proporção entre as células marcadas foi transformada em valores percentuais e o cálculo estatístico foi realizado somente com as células em mitose.

4.11 ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DAS MMP2 E MMP9

A análise das MMPs baseou-se primeiramente no grau de intensidade da marcação que se referiu ao compartimento celular citoplasmático, revelado por DAB, conforme metodologia descrita por Di Niezza (2002). O critério de avaliação qualitativo utilizado, variou entre os números 0 e 3 para cada lâmina examinada separadamente. O número 0 representou a não marcação evidente, 1 (marcação fraca); 2 (semi forte) e 3 (marcação forte). O percentual de células positivas em cada compartimento celular foi também especificado. Em casos em que pairaram dúvidas, ou as lâminas em que obtivesse uma marcação muito heterogênea, o tecido fora descartado.

Para análise quantitativa, foram contabilizadas 3000 células entre positivas e negativas para cada lâmina, sendo a média de cada valor, multiplicada ao respectivo grau de intensidade e posteriormente realizado o teste estatístico.

4.12 ANÁLISE QUANTITATIVA – CASPASE 3

Para quantificação do número de células em apoptose, em cada amostra do tecido, foram quantificadas 1000 células, cujos núcleos foram marcados pela Caspase 3 Clivada, sendo identificados pela coloração marrom, devido a revelação por DAB. A quantificação foi realizada com objetiva de 40X, em aproximadamente 10 campos histológicos. Para tanto foi utilizado o mesmo programa de software para Análise de Imagem - *Image Pro Plus*, versão 4.5 para Windows, edição 2002. A proporção entre as células marcadas foi transformada em valores percentuais e o cálculo estatístico foi realizado somente com as células positivas.

4.13 TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA (IF)

Esta técnica foi utilizada na identificação da localização das Cxs 26 e 43. Entretanto, a fim de se evitar artefatos de técnica e falso positivo, o autor da tese, utilizou como controle positivo órgãos de cães coletados durante a necrópsia, que expressam altas quantidades de Cx26, no caso do fígado e Cx 43 no caso do coração, e como controle negativo os mesmos passos da técnica foram seguidos sem adição de anticorpo primário.

Os cortes histológicos foram processados até a etapa do bloqueio da peroxidase endógena, conforme descrito no item 4.5. Para a marcação das Cx26 e Cx43, foram utilizados os anticorpos primários anti-Cx26 (Zymed®, 1:1000) e anti-Cx43 (Zymed®, 1:200), em solução de bloqueio do *kit* TSA (*Tyramide Signal Amplification, New Life Science Products®*). Os cortes foram incubados com anticorpos secundários anti-imunoglobulinas de coelho biotinilados (*Dako Corporation rabbit polyclonal - 1:500*), seguindo-se a conjugação com o complexo estreptavidina e tiramida do *kit* TSA. Por fim, os cortes foram incubados com Iodeto de Propídeo (Sigma® - 1:1000), para marcação nuclear e montada sob lamínula com Vectashield (Vector®), para evitar o esgotamento da fluorescência. As imagens foram obtidas em microscópio Nikon E-800, equipado com sistema de fluorescência.

4.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT (WB)

Para a quantificação da expressão das conexinas, 40 µg de tecido, previamente congelado ao freezer -80°C, foi cortado em pequenos pedaços e submetido à lise celular por homogeneização através do Tissue Teator^{tu} na velocidade máxima. Todas as etapas foram realizadas com as amostras mantidas à 4°C. As proteínas eram extraídas com *sample buffer* (Tris-HCl 1 M, pH 6,8, contendo SDS 10% e Glicerol 10%) e centrifugadas à 15000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante era retirado e acrescido de Tris-HCl 1 M, pH 6,8; contendo SDS 10%; Glicerol 10%; DTT 1M; e PMSF 10 mM e centrifugando à 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante retirado era conservado à -80°C até análise. A concentração da proteína total foi estimada com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad Labs®). Na eletroforese utilizou-se 150µg de proteína acrescida de azul de Bromofenol, separada em SDS-PAGE a

10%. A eletroforese foi realizada a 40W por um período de 4 horas. Como marcador de peso molecular utilizou-se 10µl do Kaleidoscópio padrão pré-corado (Bio-Rad Labs®). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas a 47 mA durante 40 minutos para uma membrana de PDVF 8,0 x 5,0 cm² (*Tans-Blot SD cell*; Bio-Rad Labs®), previamente umedecida em metanol por 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 15 minutos, em TTBS 0,2% contendo Tween 20. A membrana foi incubada em leite desnatado (*skin milk*) 5%, diluído em TTBS por 2 horas sob leve agitação a temperatura ambiente. Em seguida a mesma foi incubada a *overnight* a 4°C, em soluções com anticorpos primários Cx 26 (1:1000) e Cx43 (1:100) diluído em TTBS 0,2% contendo *skin milk* 5%. A membrana foi lavada em TTBS e o excesso de tampão removido em papel de filtro. Procedeu-se à incubação com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (1:2000) por 2 horas nas mesmas condições acima citadas. A revelação foi efetuada mergulhando-se a membrana por alguns segundos em uma solução de DAB-níquel acrescido de 20µl de peróxido de hidrogênio a 30%. O bloqueio da reação foi realizada pelo mergulho da membrana em água MiliQ e logo em seguida a membrana foi escaneada (*Image Máster VDS-CL*, Amersham *pharmacia biotech*®). A β actina foi a proteína escolhida como controle endógeno da reação, ou seja, a densitometria foi calculada através da porcentagem da proteína analisada em relação a β actina.

Esta técnica é muito sensível e exige que o material coletado esteja íntegro, pois áreas de necrose ou inflamação tecidual podem acarretar em degradação protéica e comprometer o material o que torna inviável o processamento do mesmo. Por este motivo algumas amostras foram descartadas durante o procedimento, trabalhando-se com um número reduzido de tumores.

4.15 TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

A expressão das Cx26 e 43, da caderina-E e MMPs2 e 9 foram verificadas através dos níveis de RNAm. Para tanto, o total foi extraído do tecido de melanoma por meio de uma técnica com etapa única utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo do fabricante.

O pellet resultante (RNA-Total) foi solubilizado em 20µl de água tratada com DEPC. Após a solubilização, o RNA total foi purificado em uma coluna de purificação *Rneasy*

Clean-Up Kit (QIAGEN®). O DNA genômico foi digerido com Dnase I (Invitrogen®). Uma alíquota foi removida para verificar a integridade do RNA em gel e para sua quantificação em Biofotômetro (Eppendorf®). O restante da solução foi armazenada imediatamente a -80°C até a confecção do cDNA. Para a transcrição reversa, 3 μg do RNA total foram acrescidos 1 μl de dNTP (mix 10mM – 2,5 mM de cada dNTP) e 1 μl de Oligo DT e incubado a 65°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 4 μl de buffer 5x (superscript III), 2 μl DTT 1M e 1 μl de RNase OUT e incubado por 2 minutos a 42°C . Acrescentou-se 1 μl de superscript III, incubando-se por 50 minutos a 42°C , seguido de incubação por 15 minutos a 70°C . Ao término da incubação foi acrescentado 1 μl de enzima RNase H aos tubos (para retirada dos resíduos de RNA da amostra de cDNA) e incubados a 37°C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da amplificação do cDNA.

Todos os reagentes foram adquiridos da Invitrogen Life Technologies®. O PCR em Tempo Real foi realizado em ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems®, Foster City, CA) utilizando TaqMan Universal Master Mix (número do item 4304437; Applied Biosystems). primers e as sondas TaqMan para MMP2; MMP9; Cx43, Cx26; caderina-E e 18 s (usado como um controle de limpeza). Para quantificação foram selecionados através do programa de software Primer Express (Applied Biosystems®) e controlado por um local de pesquisa básica alinhado à ferramenta de busca do GenBank. Primers para Cx43 foram concebidos a partir de exons (GenBank XM_543178), em frente 5'CTCATCTACCTGGGCCATGTG 3' e 5' TCGCGCTCCTTCTTCTTCTC 3' primers reverse e CF-RG6M2-Cx43, FAM, CCATGCGCACGATGTG. Os ensaios da Cx26 (Cf02690416_g1), Cx43 (Cf02690400_g1), MMP2 (Cf02623423_m1); MMP9 (Cf02621851_g1) e caderina-E (Cf02624269_μ1) foram adquiridos pela *Applied Biosystems*®.

Utilizou-se o 18S, como controle de limpeza, sendo adquirido pela *Applied Biosystems*® (4319413E). Para as sondas TaqMan utilizaram-se um corante repórter 5'-6-carboxi-fluoresceína (FAM), um corante quencher 3'-não-fluorescente (QNN) e uma ligação menor *groove* (MGB). Os primers e sondas foram utilizadas com eficiência de 100% na concentrações finais de 0,9 mM e 0,25 mM, respectivamente. As condições de ciclagem térmica para os ensaios de quantificação do DNA foram estabelecidas de acordo com a ABI Prism 700 Sequence Detection System parâmetros (*Applied Biosystems*®). A análise dos dados de expressão relativa do gene foi realizada de acordo com o método CT.

A qualidade das amostras de RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 2% com coloração para Brometo de Etídio. As bandas 18S e 28S foram visualizadas sob luz ultravioleta (não mostrado). O RNA total foi então tratado com DNase I (Invitrogen Life Technologies®), antes do processamento. O Oligo DT (1 ml) e dNTPs (1 ml) foram adicionados à amostra de RNA total (500 mg) e incubados a 65°C por 5 minutos. Após este procedimento, foram adicionados à mistura: Buffer 5 x (sobrescrito II, 4 µl); TDT (1 ml, 2µl) e RNase OUT (1 µl) e incubado a 42°C por 2 minutos. Novamente o sobrescrito II (1 ml) foi adicionado, seguindo uma incubação à 42°C por 50 minutos e posteriormente, a incubação foi realizada a 70°C por 15 minutos.

Dois níveis de transcrição em relação ao controle melanótico foram e todos os experimentos em PCR tempo real foram realizados pelo menos três vezes. Esta técnica permitiu quantificar a expressão do gene das Cx 26 Cx e 43 e das MMP2 e MMP9 e caderina-E, comparando as mesmas entre os tipos histológicos e fenótipo.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise quantitativa, foram utilizados dois tipos de análises estatísticas diferentes: a Análise Anova *one way* a fim de avaliar diferenças entre os três tipos histológicos (epitelióide, fusiforme e misto) , tendo como pós teste o teste de *Tukey*. E o *Test t Student* (paramétrico) utilizado sempre em que se comparou a diferença entre os fenótipos (melânico e amelânico). A análise estatística teve como valor de significância $P < 0,05$.

Foram realizadas as análises estatísticas da diferença entre o número de células em proliferação celular (PCNA), índice mitótico, quantificação das MMP2 e MMP9 e Caspase 3 clivada. A Análise da densitometria das bandas protéicas para as Cx26 e Cx43 pelo *western blot*, a expressão gênica pelo PCR em Tempo Real para ambas conexinas, MMPs e caderina-E.

Para análise da curva de sobrevida, ou Kaplan Meier, foi utilizado o programa software *Graph Pad Prism*, versão 5.0.

5 RESULTADOS

Os resultados foram analisados, conforme os dados obtidos durante a coleta dos tumores, classificando-nos de acordo com os subtipos histológicos diferentes (epitelióide, fusiforme, misto) e célula de balão, que foi descartada e quanto à presença ou ausência de melanina (melânico ou pigmentado e amelanico). Estes dados foram confrontados com o histórico clínico e epidemiológico. O diagnóstico dos tumores amelanicos foi realizado por meio da técnica de imuno-histoquímica. Outras técnicas foram utilizadas para as demais avaliações moleculares, como Imunofluorescência, *Western Blot* e PCR em Tempo Real.

5.1 ANIMAIS

Todos os animais foram atendidos pelo Hospital veterinário (HOVET) da FMVZ/USP (Figura 8), posteriormente encaminhados ao Departamento de Cirurgia, onde realizaram-se os procedimentos cirúrgicos, pelos pós-graduandos e residentes do Laboratório de Odontologia Comparada (LOC). Após os procedimentos, os pacientes não foram submetidos a quaisquer tipos de tratamentos adjuvantes, fossem eles a quimioterapia, radioterapia, eletroquimioterapia, entre outros.

Como já fora relatado anteriormente, a fim de se verificar a extensão da doença, de se definir o TNM e avaliar a saúde do animal, todos pacientes foram submetidos a exames pré-operatórios que incluíram Radiografias de tórax e cabeça, Tomografia Computadorizada de cabeça e hemograma completo. Com consentimento prévio do proprietário, dois animais foram eutanasiados antes do procedimento cirúrgico, devido ao estágio avançado do melanoma, ao prognóstico desfavorável e sofrimento físico do paciente.

Fotos cedidas pelo M.V. Marco Antônio Leon Roman - LOC.

Figura 8 - (A) Cão da raça Doberman, atendido pelos residentes no Laboratório de Odontologia FMVZ/USP. Nota-se deformação da maxila esquerda devido a presença do melanoma. (B) Cão da raça Pastor Alemão Branco, eutanasiado após a confirmação de metástase em pulmão e linfonodos e sofrimento físico do animal

5.2 DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Todas as informações referentes aos dados clínicos e gerais dos pacientes e as principais características macro e microscópicas dos tumores, encontram-se disponíveis no Quadro 6. De acordo com o levantamento epidemiológico, os cães machos foram os mais acometidos (14 animais) versus 11 fêmeas. Contudo, não foi possível encontrar uma predisposição sexual quanto aos tipos histológicos ou fenótipos do melanoma.

No que se refere a raça, não houve uma predisposição racial, no entanto, cães Sem Raça Definida (SRD) apresentaram-se em maior número (7 casos dos 25 atendidos). Quanto à localização dentro da cavidade bucal, a mucosa foi a região mais acometida, principalmente em regiões de mandíbula e maxila.

No que concerne a morfologia, os melanomas do tipo epitelióide foram os mais comuns (48%), seguidos pelos tipo fusiforme (28%) e misto (24%) (Tabela 1). Ao que concerne ao período de “evolução tumoral”, tempo que se baseou no relato do proprietário feito ao médico veterinário que atendeu o paciente pela primeira vez, período este, em que o proprietário havia tomado conhecimento da presença daquele tumor, o melanoma misto apresentou o menor tempo de evolução tumoral e ainda o mesmo tipo morfológico, foi responsável por atingir os pacientes mais jovens (Tabela 1). A metástase ocorreu entre os animais com os três tipos histológicos de melanoma, não ficando restrito a um único tipo morfológico, todavia, com maior prevalência entre os animais com melanoma epitelióide

RESULTADOS

(16%) (Tabela 1). Vale à pena ressaltar que na Tabela 1, não foi feita a distinção entre melânico e amelânico, isto significa que a análise foi feita sob os aspectos morfológicos somente, independentemente do fenótipo, que os amelânicos foram “diluídos” e classificados quanto aos três subtipos.

Quando se comparou os fenótipos, os melanomas melânicos foram os mais comuns (64%), sendo responsáveis por atingir os pacientes mais velhos, com faixa etária que variou entre 8 e 10 anos. Cães com melanomas amelânicos, foram menos comuns (36%) e apresentaram uma faixa etária menor, entre 4 e 8 anos (Tabela 2). Proprietários dos cães com melanoma melânico notaram a presença do tumor, ou o tempo de “evolução tumoral” foi verificado em torno do terceiro mês e em cães com melanomas amelânicos, entre o 45º dia e 2º mês (Tabela 2). Ao que concerne a metástase, em ambos os grupos de cães com melanoma a desenvolveram, sendo que três animais com melanoma melânico e dois com amelânico tiveram os linfonodos regionais acometidos e dois pacientes do grupo melânico e 1 do amelânico tiveram acometimento de linfonodo e pulmão (Tabela 2).

RESULTADOS

Continua

Nome	Raça	Idade	Sexo	Localização	Evolução T.	Macroscopia	Tamanho	Tipo	Metástase
Negãozão	SRD	12 anos	M	Mandíbula E	90 Dias	Sessil;enegrecido;não lobulado	5cm – 2cm	Epitelióide	Sem metástase
Thor	Pit Bull	11 anos	M	Mandíbula D	180 Dias	Mole;enegrecido; hemorrágico	1cm – 6cm	Epitelióide	Sem metástase
Kadii	Poodle	14 anos	F	Maxila D	120 Dias	Sessil;enegrecido;hemorrágico	5cm – 3cm	Epitelióide	LN - Pulmão
Barney	Cocker S.	7 anos	M	Palato Mole	90 Dias	Pedunculado, pigmentado	3cm – 1cm	Epitelióide	LN - Pulmão
Dick	Pinsher	8 anos	M	Maxila D	180 Dias	Sessil;enegrecido;lobulado	5cm – 7cm	Epitelióide	Sem metástase
Mike	Doberman	8 anos	M	Maxila E	240 Dias	Sessil;enegrecido	3cm – 2cm	Epitelióide	Sem metástase
July	Poodle	9 anos	F	Maxila E	90 Dias	Sessil;enegrecido;ulcerado	1cm – 2cm	Epitelióide	Sem metástase
Tinha	SRD	11 anos	F	Maxila D	30 Dias	Pedunculado, escuro, purulento	4cm – 3cm	Epitelióide	Sem metástase
Azulão	P.A.	10 anos	M	Palato Duro	240 Dias	Sessil; escuro; hemorrágico	2cm – 3cm	Fusiforme	L. N.
Dinho	Pinscher	12 anos	M	Mandíbula E	90 Dias	Pedunculado; escuro	1cm – 3cm	Fusiforme	Sem metástase
Bethoven	SRD	10 anos	M	Mandíbula D	150 Dias	Mole;enegrecido; hemorrágico	4cm – 2cm	Fusiforme	Sem metástase
Neguinha	SRD	8 anos	F	Mandíbula E	14 Dias	Mole;enegrecido; hemorrágico	5cm – 3cm	Fusiforme	Sem metástase
Duda	Cocker S.	7 anos	F	Maxila D	21 Dias	Sessil;enegrecido;hemorrágico	2cm – 1cm	Misto	L.N.
Fred	SRD	8 anos	M	Maxila D	60 Dias	Mole, enegrecido	3cm – 4cm	Misto	Sem metástase
Paloma	P.A.	9 anos	F	Mandíbula D	70 Dias	Sessil;róseo;hemorrágico	2cm – 3cm	Misto	Sem metástase
Kika	Rotweiller	10 anos	F	Maxila E	90 Dias	Mole, sessil, hemorrágico	3cm – 5cm	Misto	Sem metástase
Tuty	Pinsher	10 anos	F	Mandíbula E	60 Dias	Sessil; roséo; ulcerado	3cm – 5cm	Amelânico	L.N.
Urso	P.A. Brco	1 ano	M	Maxila D	1 mês	Mole; róseo; hemorrágico	4cm – 2cm	Amelânico	LN - Pulmão

RESULTADOS

Nome	Raça	Idade	Sexo	Localização	Evolução T.	Macroscopia	Tamanho	Tipo	Conclusão
									Metástase
Nego	P.A.	8 anos	M	Lábio Superior	60 Dias	Mole; marrom; ulcerado	5cm – 3cm	Amelânico	Sem metástase
Dartanhã	Beagle	4 anos	M	Mandíbula D	40 Dias	Mole; cinza; ulcerado	3cm – 2cm	Amelânico	Sem metástase
Cindy	SRD	10 anos	F	Maxila E	90 Dias	Mole; róseo; hemorrágico	1cm – 2cm	Amelânico	Sem metástase
Laila	Poodle	4 anos	F	Mandíbula E	15 Dias	Mole; róseo; hemorrágico	3cm – 2cm	Amelânico	Sem metástase
Deep	Cocker S.	11 anos	M	Maxila E	70 Dias	Sessil, marrom	2cm – 4cm	Amelânico	Sem metástase
Suzy	SRD	7 anos	F	Mandíbula	120 Dias	Duro; róseo, hemorrágico	2cm – 3cm	Amelânico	L.N.
Tigrão	Cocker	4 anos	M	Lábio	45 Dias	Pedunculado, cinza	1cm-1cm	Amelânico	Sem metástase

Quadro 6 – Histórico clínico e epidemiológico dos pacientes e melanomas

RESULTADOS

Tabela 1 - Características clínicas e epidemiológicas quanto ao tipo histológico

Tipo Histológico	Epitelióide	Fusiforme	Misto
Número de casos	N=12 (48%)	N=7 (28%)	N=6 (24%)
Faixa etária (anos)			
1	-----	-----	N=1 (4%)
3	-----	N=1 (4%)	-----
4	N=1 (4%)	N=1 (4%)	N=2 (8%)
7	N=3 (12%)	N=1 (4%)	-----
8	N=2 (8%)	N=1 (4%)	N=1 (4%)
10	N=1 (4%)	N=2 (8%)	N=1 (4%)
11	N=2 (8%)	-----	-----
12	N=1 (4%)	N=1 (4%)	-----
13	N=1 (4%)	-----	-----
14	N=1 (4%)	-----	-----
Tempo de evolução tumoral			
15 dias	-----	-----	N=1 (4%)
30 dias	-----	-----	N=1 (4%)
45 dias	N=2 (8%)	N=1 (4%)	-----
60 dias	N=2 (8%)	N=2 (8%)	N=2 (8%)
75 dias	N=2 (8%)	N=1 (4%)	N=1 (4%)
90 dias	N=1 (4%)	N=2 (8%)	-----
105 dias	N=1 (4%)	-----	N=1 (4%)
120 dias	N=3 (12%)	N=1 (4%)	-----
140 dias	N=1 (4%)	-----	-----
Metástase em órgãos	N=4 (16%)	N=2 (8%)	N=2 (8%)
Linfonodos (LN)	N=2 (8%)	N=2 (8%)	N=1 (4%)
LN + Pulmão	N=2 (8%)	-----	N=1 (4%)
Lise Óssea	N=2	N=2	N=1
Eutanasiados	N=1	N=1	-----

RESULTADOS

Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas quanto ao fenótipo

Fenótipo	Melânicos	Amelânicos
Número de casos	N = 16 (64%)	N = 9 (36%)
Faixa etária (anos)		
1	-----	N=1 (4%)
3	N=1 (4%)	N=1 (4%)
4	N=1 (4%)	N=3 (12%)
7	N=1 (4%)	N=1 (4%)
8	N=4 (16%)	N=1 (4%)
10	N=3 (12%)	N=1 (4%)
11	N=2 (8%)	N=1 (4%)
12	N=2 (8%)	-----
13	N=1 (4%)	-----
14	N=1 (4%)	-----
Tempo de evolução tumoral		
15 dias	-----	N=1 (4%)
30 dias	-----	N=1 (4%)
45 dias	N=2 (8%)	N=2 (8%)
60 dias	N=3 (12%)	N=2 (8%)
75 dias	N=3 (12%)	N=1 (4%)
120 dias	N=4 (16%)	N=1 (4%)
105 dias	N=2 (8%)	N=1 (4%)
120 dias	N=1 (4%)	-----
140 dias	N=1 (4%)	-----
Metástase em órgãos	N=5 (20%)	N=3 (12%)
Linfonodos (LN)	N=3 (12%)	N=2 (8%)
Pulmão	-----	-----
LN + pulmão	N=2 (8%)	N=1 (4%)
Lise Óssea	N=4	N=3
Eutanasiados	N=1	N=1

RESULTADOS

A fim de se traçar uma curva de sobrevida dos animais, após o procedimento cirúrgico e correlacionar esta informação as diferenças histológicas e fenotípicas do tumor, todos os animais foram acompanhados após a cirurgia, através dos prontuários.

Dos 25 animais atendidos, dois pacientes foram eutanasiados momentos antes de se iniciar a cirurgia, devido a gravidade do quadro clínico e sofrimento físico e três animais morreram horas após o procedimento cirúrgico, em decorrência do pós-anestésico e neste caso, os mesmos não foram contabilizados na análise da sobrevida. Dez pacientes foram encaminhados ao grupo da dor, serviço prestado por pós-graduandos do Departamento de Cirurgia (HOVET – FMVZ/USP).

Quanto à análise da curva de sobrevida entre os tipos morfológicos, não houve diferença estatística entre eles (Gráfico 1). No entanto, quando se analisou a curva de sobrevida dos animais, quanto ao fenótipo dos melanomas, pode-se notar menor tempo de sobrevida dos pacientes com melanoma amelanico ($P = 0.0094$) (Gráfico 2).

Gráfico 1 - Curva de sobrevida dos animais (Kaplan Meier), que foram acompanhados após o procedimento cirúrgico até a data do óbito. Diferença entre os tipos histológicos. Não houve significância estatística

Gráfico 2 - Curva de sobrevida dos animais (Kaplan Meier), que foram acompanhados após o procedimento cirúrgico até a data do óbito. Diferença entre os fenótipos. Os animais com melanoma amelanico tiveram uma sobrevida menor

5.3 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Os tumores coletados apresentavam consistência que variou entre mole e dura, com coloração entre cinza e negra (Figura 9 A), sendo que os amelanicos geralmente eram castanhos claros ou róseos (Figura 9 B). Sempre que foi possível, os melanomas foram extraídos com a obtenção da margem de segurança adequada, através da realização de cirurgias radicais, que incluíram a mandibulectomia e maxilectomia (Figura 9 C).

Figura 9 - (A) Foto macroscópica de melanoma em maxila esquerda de cão. Coloração escura, em forma de placa e vegetante. (B) Foto macroscópica de melanoma em maxila direita de cão, coloração rósea, em forma de placa e sésil. (C) A foto denota a sutura realizada no palato mole e duro de um cão após a ressecção cirúrgica do tumor e realizada a técnica de hemi-maxilectomia

5.4 ASPECTOS MICROSCÓPICOS

No total foram coletados 61 tumores provenientes da cavidade bucal, sendo: 25 Melanomas; 14 Carcinomas de Células Escamosas; 8 Epulides Acantomatoso; 6 Epúlides Ossificantes; 4 Fibrossarcomas; 2 Mastocitomas; 1 Carcinoma de Célula Basal e 1 Plasmocitoma. Os tumores que não se tratavam de melanomas foram descartados do trabalho, porém permanecem congelados em freezer -80°C para estudos futuros e arquivamento em banco de tumores. Dos 25 cães com melanoma analisados, dezesseis eram melânicos, entre eles: 8 epitelióides, 4 fusiformes, 4 melanomas mistos (Figuras 10 A; B e C) e entre os nove animais com melanoma amelanico: 4 epitelióides, 3 fusiformes e 2 melanomas mistos (Figuras 11 A; B e C). De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que tipo histológico epitelióide e o melanoma melânico são os mais comuns. Para identificação dos melanomas amelanicos, lançou-se mão da técnica de imuno-histoquímica, com os marcadores especificados (Figura 12). Quanto ao uso dos marcadores, o HMB45 e

RESULTADOS

Melan-A, ambos tiveram uma fraca marcação, devido à baixa sensibilidade dos mesmos (Figuras 12 C e D) (SUNDRAM et al., 2003).

Todos os melanomas independentemente do tipo histológico ou seu fenótipo apresentaram sinais de malignidade compatíveis com a gravidade da doença, tais como extensas áreas de necrose e úlcera, infiltrados inflamatórios e alto número de mitoses. Estas características foram observadas em todo o tecido tumoral, não ficando restritas somente áreas de vasos ou pontos isolados.

Figura 10 - Fotomicrografia de melanomas melânicos: (A) Melanoma Epitelióide. É possível verificar células com núcleos grandes e citoplasmas arredondados caracterizando este tipo histológico. Algumas células apresentam citoplasmas com coloração castanhada devido ao excesso de melanina. (B) Melanoma Fusiforme: é possível notar que as células apresentam citoplasmas em forma de fuso evidenciado este tipo histológico. (C) Melanoma Misto: células em formato arredondado e ou fusiforme no entanto sem presença de melanina no citoplasma. H.E. O valor de 10 µm corresponde ao aumento de 40X

Figura 11 - Fotomicrografia de melanomas amelânicos: (A) Melanoma Epitelióide. É possível verificar células com núcleos grandes e citoplasmas arredondados caracterizando este tipo histológico. Algumas células apresentam citoplasmas com coloração castanhada devido ao excesso de melanina. (B) Melanoma Fusiforme é possível notar que as células apresentam citoplasmas em forma de fuso evidenciado este tipo histológico. (C) Melanoma Misto: células em formato arredondado e ou fusiforme no entanto sem presença de melanina no citoplasma. H.E. O valor de 10 µm corresponde a objetiva de 40X

Figura 12 – Fotomicrografia correspondente às células de melanomas amelanicos corados pela técnica de imuno-histoquímica. (A) Anticorpo para Vimentina, marcação citoplasmática acastanhada. (B) Anticorpo para proteína S-100, marcação citoplasmática acastanhada. (C) Anticorpo para Enolase Neuro-Específica. (D) Anticorpo para HMB45, marcação acastanhada. (E) Anticorpo para Melan-A. A barra 10µm corresponde a objetiva de 40X

5.5 INTENSIDADE DA MARCAÇÃO PARA CADERINA-E (IHQ)

Esta análise se baseou na intensidade da marcação do tecido tumoral melanocítico, por meio do uso da imuno-histoquímica e revelação por DAB (Figura 13). Pôde-se verificar que a intensidade da marcação foi mais fraca entre o melanoma misto, seguidos pelo fusiforme e epitelióide, em ordem decrescente (Quadro 7). Quanto ao fenótipo, foram observadas marcações entre forte e moderada nos melanomas melânicos e marcação fraca a moderada entre os amelânicos (Quadro 8), sendo que em alguns casos as localizações foram citoplasmáticas, o que caracteriza uma localização aberrante, pois a caderina-E é um marcador de membrana plasmática. Estes fatores podem ter sido atribuídos a maior perda da adesão intercelular ocorrendo entre os melanomas mistos e amelânicos.

A fim de se descartar a possibilidade de artefato de técnica, a marcação do tecido tumoral sempre foi comparada ao tecido epitelial íntegro e com a neoplasia melanocítica benigna (Melanocitoma) (Figura 13 E), cuja marcação da caderina-E é predominantemente forte. Entre algumas amostras tumorais não houve marcação da Caderina-E e outras não apresentavam o epitélio devido à extensa lesão ulcerativa.

RESULTADOS

Histológico	Localização	Intensidade
1054H1 - Epitelióide	Citoplasma	Moderado (++)
1072H8 - Epitelióide	Sem marcação	Sem marcação
1072H16 - Epitelióide	Citoplasma	Forte (+++)
1072H20 - Epitelióide	Membrana	Fracos (+)
1072H25 - Epitelióide	Sem marcação	Sem marcação
1072H27 - Epitelióide	Citoplasma	Moderado (++)
1072H40 – Epitelióide	Membrana	Forte (+++)
1072H45 Epitelióide	Membrana	Forte (+++)
1072H4 - Misto	Membrana	Moderado (++)
1072H14 - Misto	Membrana	Forte (+++)
1072H39 - Fusiforme	Citoplasma	Moderado (++)
1072H42 – Misto	Membrana	Fracos (+)
1072H22 - Fusiforme	Citoplasma	Fracos (+)
1072H23 - Fusiforme	Membrana	Fracos (+)
1072H36 - Fusiforme	Membrana	Fracos (+)
1068H – Misto	Membrana	Moderado (++)
1069H - Fusiforme	Sem marcação	Sem marcação
1072H11 - Epitelióide	Citoplasma	Moderado (++)
1072H15 - Epitelióide	Sem Marcação	Sem Marcação
1072H18 - Misto	Membrana	Fracos (+)
1072H21 - Epitelióide	Membrana	Fracos (+)
1072H24 - Fusiforme	Citoplasma	Fracos (+)
1072H34 - Epitelióide	Membrana	Moderado (++)
1072H37 - Misto	Membrana	Fracos (+)

Quadro 7 - Intensidade da marcação do tecido tumoral para caderina-E quanto ao tipo histológico

RESULTADOS

Fenótipo	Localização	Intensidade
1054H1 - Melânico	Citoplasma	Moderado (++)
1072H8 - Melânico	Sem marcação	Sem marcação
1072H16 - Melânico	Citoplasma	Forte (+++)
1072H20 - Melânico	Membrana	Fracos (+)
1072H25 - Melânico	Sem marcação	Sem marcação
1072H27 - Melânico	Citoplasma	Moderado (++)
1072H40 – Melânico	Membrana	Forte (+++)
1072H45 Melânico	Membrana	Forte (+++)
1072H4 - Melânico	Membrana	Moderado (++)
1072H14 - Melânico	Membrana	Forte (+++)
1072H39 - Melânico	Citoplasma	Moderado (++)
1072H42 – Melânico	Membrana	Fracos (+)
1072H22 - Melânico	Citoplasma	Fracos (+)
1072H23 - Melânico	Membrana	Fracos (+)
1072H36 - Melânico	Membrana	Fracos (+)
1068H – Amelânico	Membrana	Moderado (++)
1069H - Amelânico	Sem marcação	Sem marcação
1072H11 - Amelânico	Citoplasma	Moderado (++)
1072H15 - Amelânico	Sem Marcação	Sem Marcação
1072H18 - Amelânico	Membrana	Fracos (+)
1072H21 - Amelânico	Membrana	Fracos (+)
1072H24 - Amelânico	Citoplasma	Fracos (+)
1072H34 - Amelânico	Membrana	Moderado (++)
1072H37 - Amelânico	Membrana	Fracos (+)

Quadro 8 – Intensidade da marcação do tecido tumoral para caderina-E quanto ao fenótipo

Figura 13 - (A) Exemplo de marcação citoplasmática. Não é comum, pois o anticorpo para caderina-E trata-se de um marcador de membrana. (B) Células tumorais com marcação em membrana fraca (+) para caderina-E (seta). (C) Células tumorais com marcação em membrana moderada (++) para caderina-E (seta). (D) Exemplo de marcação forte (+++) para caderina-E (E) Melanocitoma marcado com caderina-E. As lâminas foram coradas por DAB através da técnica de imunohistoquímica. (Barra = Objetiva de 40X)

5.6 MARCAÇÃO E MORFOLOGIA PARA PCNA (IHQ)

Comparou-se a intensidade da marcação nuclear para PCNA, por meio da técnica de imuno-histoquímica, sendo a revelação feita por meio do DAB, entre os três tipos morfológicos e os fenótipos dos melanomas. É possível verificar uma intensa marcação em todas as amostras, o que demonstra uma forte reação imuno - fenotípica pelo anticorpo primário (anti-PCNA), não sendo possível avaliar diferença de intensidades entre eles (Figura 14).

Figura 14 – Fotomicrografia dos melanomas marcados pelo anticorpo PCNA. Nota-se os núcleos das células contra-corados por marrom, devido a revelação por DAB. O mesmo padrão foi verificado nos três tipos histológicos e fenótipo analisados (10μm = 40X)

5.6.1 Análise Quantitativa - PCNA

Para análise estatística do número de células positivas para PCNA entre os três tipos histológicos, utilizou-se o teste ANOVA *one way*, não demonstrando diferença estatística (Gráfico 3 A). No entanto, quando se analisou a diferença entre o fenótipo dos melanomas, pelo *Test t Student*, verificou-se uma diferença estatística ($P = 0.048$) com aumento do número de células positivas (PCNA) entre os amelanicos, concluindo que há um aumento do número de células em proliferação, portanto, um crescimento mais acelerado entre este grupo de melanoma (Gráfico 3 B).

Gráfico 3 - Quantificação das células positivas para PCNA. (A): Não houve diferença entre os 3 subtipos histológicos. (B) Aumento do número de células em proliferação entre os melanomas amelânicos ($P=0.0048$). Significância ($P \leq 0.05$)

5.7 ANÁLISE QUANTITATIVA – ÍNDICE MITÓTICO

A fim de complementar os dados obtidos durante a análise do PCNA, realizou-se a quantificação do número de células em mitose. O que se verificou foi uma diferença estatística quanto ao fenótipo ($P = 0,0036$), com aumento do número de células em mitose entre os melanomas amelânicos (Gráfico 4 A). Quanto aos subtipos morfológicos, uma diferença estatística significativa também foi verificada, com o aumento do número de células em mitose entre os melanomas mistos ($P = 0.0071$) (Gráfico 4 B).

Gráfico 4 - Diferença estatística da quantificação do n. de células em mitose. (A) Aumento do n. de mitose entre os melanomas amelânicos ($P=0,0036$). (B) Aumento do n. de células em mitose entre os melanomas mistos ($P=0.0071$)

5.8 MARCAÇÃO E MORFOLOGIA PARA CASPASE 3 PELA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A fim de se quantificar a morte celular programada dos melanomas, utilizou-se a marcação para caspase-3, pela técnica de imuno-histoquímica. Foi possível verificar uma marcação fraca e moderada entre os tipos morfológicos e fenótipos, não sendo possível identificar uma diferenciação quanto a intensidade entre eles (Figura 15). Embora a marcação da caspase 3 seja predominantemente citoplasmática, houve marcações específicas no núcleo das células com melanoma, observada na maioria das amostras (Figura 15 A e B).

Figura 15 - Fotomicrografia da caspase 3 em tecido de melanoma. (A) É possível verificar marcação nuclear e citoplasmática (flechas vermelhas) reveladas por DAB – técnica de IHQ. Barra = objetiva de 20X. (B) É possível verificar marcação nuclear e citoplasmáticas (flechas vermelhas) reveladas por DAB – técnica de IHQ. Barra = objetiva de 40X

5.8.1 Análise Quantitativa – Caspase 3

De acordo com a análise quantitativa das células positivas para Caspase-3, houve uma diferença estatística entre os fenótipos dos melanomas ($P = 0.021$) com diminuição das células em apoptose entre os amelanicos (Gráfico 5 A). Todavia, a mesma diferença não fora observada entre os subtipos morfológicos (Gráfico 5 B).

Gráfico 5 - Quantificação do número de células positivas para Caspase - 3. (A) Houve diminuição do n. de células em apoptose entre os amelânicos ($P=0.021$). (B) Não houve diferença estatística quanto às células em apoptose entre os subtipos histológicos

5.9 ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO PARA MMP2

A maioria dos tecidos tumorais analisados demonstrou alta reatividade para o anticorpo anti-MMP2, pela imuno-histoquímica, cuja marcação foi predominantemente citoplasmática. No entanto, houve forte marcação entre os melanomas amelânicos e uma reatividade variada entre os subtipos histológicos. O mesmo tipo de análise qualitativa utilizado para caderina-E foi empregado neste caso, salvo as modificações na denominação dos graus (Figuras 16 A; B e C). Como controle positivo, utilizou-se o melanocitoma (Figura 16 D). As amostras que não apresentaram uma marcação predominante ou que se mostraram muito heterogêneas, dentro de um mesmo tecido, foram descartadas.

Figura 16 - Fotomicrografia de melanomas marcados pela técnica de IHQ para MMP2 em diferentes graus de intensidade. (A) Intensidade 1 ou fraca. (B) Intensidade 2 ou moderada. (C) Intensidade 3 ou forte. (D) Fotomicrografia da marcação de MMP2 para melanocitoma. Barra corresponde ao aumento de 40X

5.9.1 Análise Quantitativa - MMP2

Embora pôde se analisar através dos Quadros 10 e 11 que houve variação quanto à intensidade da marcação e o número de células positivas para MMP2 entre os subtipos histológicos e o fenótipo, não houve diferença estatística entre os mesmos, conforme pode ser observado nos Gráficos 6 (A e B).

RESULTADOS

Morfologia - Melanoma	<i>SCORE</i>	Céls (+) para MMP2
1054H1 – Epitelióide	2	1497
1072H8 – Epitelióide	2	1581
1072H16 - Epitelióide	2	1613
1072H20 - Epitelióide	0	Sem marcação
1072H25 - Epitelióide	1	1642
1072H27 - Epitelióide	2	1498
1072H40 – Epitelióide	1	1044
1072H4 – Misto	1	1513
1072H14 – Misto	2	1724
1072H14 – Misto	3	1831
1072H42 – Misto	2	1588
1072H22 – Fusiforme	2	1926
1072H23 – Fusiforme	3	1814
1068H – Misto	1	1403
1069H – Fusiforme	3	1498
1072H11 – Epitelióide	3	1617
1072H15 – Epitelóide	2	1727
1072H18 – Misto	1	1340
1072H21 – Epitelóide	3	1740
1072H24 – Fusiforme	2	1564
1072H34 – Epitelióide	2	1374
1072H37 – Misto	2	1545

Quadro 9 – Quantificação das células tumorais reagentes com MMP2 pela técnica de imuno-histoquímica quanto aos três tipos histológicos

RESULTADOS

Fenótipo - Melanoma	<i>SCORE</i>	Céls (+) para MMP2
1054H1 – Melânico	1	1497
1072H8 – Melânico	2	1845
1072H16 – Melânico	2	1613
1072H20 – Melânico	0	Sem marcação
1072H25 – Melânico	1	1642
1072H27 – Melânico	2	1498
1072H40 – Melânico	1	1044
1072H4 – Melânico	1	1513
1072H14 – Melânico	2	1724
1072H42 – Melânico	2	1588
1072H22 – Melânico	2	1926
1072H23 – Melânico	3	1814
1072H42 – Melânico	2	1588
1068H – Amelânico	3	1403
1069H – Amelânico	1	1498
1072H11 - Amelânico	3	1617
1072H15 - Amelânico	2	1727
1072H18 - Amelânico	1	1340
1072H21 - Amelânico	3	1740
1072H24 - Amelânico	2	1564
1072H34 - Amelânico	3	1374
1072H37 - Amelânico	2	1545

Quadro 10 – Quantificação das células tumorais reagentes com MMP2 pela técnica de imuno - histoquímica. Diferenciação entre melânicos e amelânicos

Gráfico 6 - (A): Número de células positivas para MMP2 entre os 3 tipos histológicos de melanoma. (B) Número de células positivas para MMP2 entre os fenótipos. Não houve diferença estatisticamente predominante

5.10 ANÁLISE QUALITATIVA DA MARCAÇÃO PARA MMP9

A maioria dos tecidos tumorais analisados demonstrou alta reatividade ao anticorpo anti-MMP9. E os três tipos de *scores* foram encontrados entre os fenótipos e subtipos morfológicos de melanomas (Figuras 17 A; B e C). Como controle positivo utilizou-se o melanocitoma (Figura 17 D).

Figura 17 - Fotomicrografia de melanomas marcados pela imuno-histoquímica para MMP9 em diferentes graus de intensidade. (A) Intensidade 1 ou fraca; (B) Intensidade 2 ou moderada; (C) Intensidade 3 ou forte. (D) Melanocitoma marcado em região de citoplasma com intensidade forte. Barra corresponde ao aumento de 40X

5.10.1 Análise Quantitativa – MMP9

Os três tipos de intensidade foram observados entre os fenótipos e tipos morfológicos de melanomas que reagiram positivamente para MMP9 (Quadros 11 e 12), tendo maior predominância de graus de intensidade 2 e 3 entre os melanomas mistos e amelanícos. De acordo com a análise estatística para MMP9 não houve diferença entre os tipos histológicos e fenótipo dos melanomas (Gráficos 7 A e B), discordando da análise qualitativa que demonstrou uma marcação mais acentuada entre os amelanícos (Figura 17 C).

RESULTADOS

Morfologia Melanoma	<i>SCORE</i>	Céls (+) para MMP9
1054H1 - Epitelióide	3	1548
1072H8 - Epitelióide	3	1800
1072H16 - Epitelióide	2	1740
1072H20 - Epitelióide	2	1540
1072H27 - Epitelióide	2	1750
1072H40 – Epitelióide	3	1801
1072H14 - Misto	1	1399
1072H17 - Misto	1	1303
1072H39 - Misto	3	1726
1072H42 – Misto	3	1527
1072H22 - Fusiforme	1	1052
1072H23 - Fusiforme	3	1337
1072H36 - Fusiforme	3	1862
1068H – Misto	3	1411
1069H - Fusiforme	0	Sem marcação
1072H11 - Epitelióide	2	1617
1072H15 - Epitelióide	3	1456
1072H18 - Misto	2	1150
1072H21 - Epitelióide	2	1591
1072H24 - Epitelióide	0	Sem marcação
1072H34 - Misto	2	1300

Quadro 11 - Quantificação das células tumorais reagentes com MMP2 pela técnica de IHQ entre os 3 diferentes tipos histológicos

RESULTADOS

Fenótipo - Melanoma	<i>SCORE</i>	Céls (+) para MMP9
1054H1 – Melânico	3	1548
1072H8 – Melânico	3	1800
1072H16 – Melânico	2	1740
1072H20 – Melânico	2	1540
1072H27 – Melânico	2	1750
1072H40 – Melânico	3	1801
1072H14 – Melânico	1	1399
1072H17 – Melânico	1	1303
1072H39 – Melânico	3	1726
1072H42 – Melânico	3	1527
1072H22 – Melânico	1	1052
1072H23 – Melânico	3	1337
1072H36 – Melânico	3	1862
1068H – Amelânico	3	1411
1069H – Amelânico	0	Sem marcação
1072H11 - Amelânico	2	1617
1072H15 - Amelânico	3	1456
1072H18 - Amelânico	2	1150
1072H21 - Amelânico	2	1591
1072H24 - Amelânico	0	Sem marcação
1072H34 - Amelânico	2	1300

Quadro 12 - Quantificação das células tumorais reagentes com MMP2 pela IHQ. Diferenciação entre o fenótipo

Gráfico 7 - Análise quantitativa da marcação para MMP9. (A) Não houve diferença significativa quanto à marcação da MMP9 entre os 3 tipos histológicos de melanoma. (B) Não houve diferença quanto à marcação da MMP9 e o fenótipo ($P \leq 0.05$)

5.11 MARCAÇÃO DAS CXS 26 E 43 EM EPITÉLIO NORMAL DE CÃES

A fim de evidenciar a localização das conexinas 26 e 43 nas camadas epiteliais saudáveis de cães, utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica para marcação de ambas as proteínas. O que se verificou foi a não expressão da Cx26 nas camadas da epiderme (Figura 18 A), somente em região inter-folicular (Figura 18 B). E a Cx 43 foi expressa na camada espinhosa e supra-basal de um epitélio saudável de cão (Figura 18 C).

Figura 18 - (A) Fotomicrografia da camada epitelial. Técnica de IHQ para marcação da Cx26, não houve marcação em nenhuma camada. (B) Marcação da Cx 26 em região interfolicular (seta vermelha). (C) Fotomicrografia da camada epitelial, técnica de IHQ para marcação da Cx43. É possível verificar marcação de conexinas entre as camadas Espinosa e supra basal. (Barra = objetiva de 40X)

5.11.1 Marcação e Localização da Cx26 pela Imunofluorescência

Embora não tenha sido evidenciada a expressão da conexina 26 em epitélio normal de cães, o contrário foi verificado quando se analisou as células de melanoma. Quanto à sua localização, em todas as amostras, verificadas separadamente, a conexina 26 apresentou uma localização citoplasmática, ou aberrante, em região peri-nuclear.

Quanto à morfologia, pode-se observar diminuição na sua expressão entre os melanomas fusiformes (Figura 19 C), quando comparado aos outros dois grupos (Figuras 19 A e B) e diminuição da expressão entre os amelanicos (Figura 20 B).

Como controle positivo utilizou-se fígado de cão, órgão com alta expressão de conexina 26 (Figura 21 A), coletado durante a necropsia e a fim de se evitar erros quanto à análise da marcação, foi realizado o controle negativo, que seguiu a mesma padronização, no entanto sem aplicar os anticorpos primários (Figura 21 B).

Figura 19 - (A) – Melanoma Epitelióide; (B): Melanoma Misto; (C): Melanoma Fusiforme. É possível visualizar diminuição da expressão da Cx26 entre os fusiformes e localização da conexina peri-nuclear. Técnica de IF – A barra corresponde ao aumento de 40X

Figura 20 - (A): Fotomicrografia em fluorescência. Visualiza-se os núcleos em vermelho e a marcação da Cx26 em região peri-nuclear em verde – melanoma melânico. (B): Visualiza-se os núcleos em vermelho e marcação da Cx26 em região peri-nuclear em verde - melanoma amelanico (Barra=40X)

Figura 21 - (A) Controle positivo para Connexina 26 do fígado de cão, é possível observar marcação em membrana dos hepatócitos. (B) Controle negativo. Foram seguidos os mesmos passos do protocolo para IF sem a adição do anticorpo primário da Cx26. É possível observar que não tem marcação (esverdeada) - 10µm corresponde a objetiva de 40X

5.11.2 Marcação e Localização da Cx43 pela Imunofluorescência

Quanto à localização da expressão da conexina 43 em melanomas, foram semelhantes à conexina 26, ou seja, predominantemente peri-nuclear entre todas as amostras e não havendo diferenciação quanto aos subtipos ou fenótipos. Alterações entre os grupos foram evidenciadas entre os melanomas fusiformes que demonstraram uma ligeira diminuição da expressão protéica (Figura 22 C) e diminuição expressiva da conexina 43 entre os amelanicos (Figura 23 B). Como controle positivo utilizou-se coração de cão coletado durante a necropsia (Figura 24 A) e como controle negativo, realizou-se os mesmos procedimentos sem acrescentar o anticorpo primário (Figura 24 B).

Figura 22 - (A) Melanoma Epitelióide; (B): Melanoma Misto; (C): Melanoma Fusiforme. É possível visualizar diminuição da expressão da conexina entre o tipo fusiforme e localização perinuclear nos três tipos. Técnica de IF, barra corresponde ao aumento de 40X

Figura 23 - (A): Foto-micrografia em fluorescência. Visualiza-se os núcleos em vermelho e a marcação da Cx43 em região peri-nuclear em verde – melanoma melânico. (B): Visualiza-se os núcleos em vermelho e a marcação da Cx43 em região peri-nuclear em verde – melanoma amelânico (Barra=400X)

Figura 24 - (A) Controle positivo para Connexina 43 de coração de cão, é possível observar marcação em membrana dos hepatócitos. (B) Controle negativo. Foram seguidos os mesmos passos do protocolo para imunofluorescência sem a adição do anticorpo primário da Cx43. É possível observar que não tem marcação (coloração esverdeada) - 10µm corresponde a objetiva de 40X

5.12 WESTERN BLOT (WB)

O resultado da técnica de western blot também foi analisado sob os aspectos qualitativo e quantitativo. Durante a análise qualitativa avaliou-se a expressão protéica das bandas das conexinas, quanto aos subtipos histológicos e o fenótipo. A análise quantitativa foi obtida pela densitometria protéica, o que permitiu transformar a análise das bandas protéicas em valores estatísticos.

Observou-se durante o experimento, um padrão heterogêneo na concentração protéica de ambas as conexinas, o que é relativamente comum por se tratar de um tecido tumoral. No entanto, para confiabilidade da técnica e visando evitar possíveis artefatos que pudessem comprometer ou confundir a análise, utilizou-se a β actina como controle endógeno.

5.12.1 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 26 (Tipo Histológico)

Não houve N significativo do melanoma misto, o que permitiu somente uma análise entre os subtipos epitelióides e fusiformes. De acordo com uma análise qualitativa, é possível observar a menor expressão da banda protéica entre os melanomas fusiformes (Figura 25 A), corroborando com a imunofluorescência (Figura 19 C). Todavia, a mesma premissa não foi sustentada pela análise estatística, pois não houve diferença significativa (Figura 25 B).

Figura 25 - (A): Análise qualitativa das bandas protéicas entre os tipos histológicos do melanoma, é possível verificar discreta diminuição na expressão da Cx26 entre os fusiformes. (B) Análise quantitativa, não houve diferença estatística quanto aos tipos histológicos. O melanoma misto não fez parte da estatística

5.12.2 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 26 (Fenótipos)

Baseado na análise qualitativa, quanto à presença ou não de melanina, entre os melanomas, é possível notar uma diminuição da expressão protéica entre os amelanícos (Figura 26 A). E este dado se confirmou através da análise estatística (Figura 26 B), corroborando com a imuno-fluorescência (Figura 20 B). E este fato pode estar diretamente relacionado ao comportamento maligno do tumor, conforme será discutido no próximo item.

Figura 26 - (A): Análise qualitativa das bandas protéicas entre os tipos histológicos do melanoma. É possível verificar diminuição da banda entre o grupo amelânico. (B) Este dado foi comprovado após análise estatística da densidade da banda protéica ($P=0.0388$)

5.12.3 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 43 (Tipo Histológico)

Quanto a análise qualitativa da Cx 43 entre os tipos histológicos, não houve diferença entre a expressão protéica das bandas (Figura 27 A), e o mesmo se confirmou através da análise quantitativa, pois não houve diferença estatística entre os melanomas fusiformes e misto (Figura 27 B). Estes dados são contrários a imunofluorescência que demonstrou diminuição de Cx43 entre as células de melanomas fusiformes (Figura 22 C).

Figura 27 - (A) Análise qualitativa da densidade das bandas protéicas para Cx43, não havendo diferença aparente. (B) Análise estatística confirmou a análise anterior pois não houve diferenças quanto a expressão protéica de Cx 43 e os tipos histológicos. O melanoma misto não fez parte da estatística.

5.12.4 Análises qualitativa e quantitativa da Cx 43 (Fenótipos)

Quanto à presença ou ausência de melanina, é possível verificar a diminuição da expressão protéica entre os amelanícos (Figura 28 A). E esta premissa foi corroborada pela análise estatística (Figura 28 B) e imunofluorescência (Figura 23 B).

Figura 28 - (A) Quantificação das bandas protéicas para conexina 43. É possível observar menor expressão da Cx43 entre os amelanícos. (B) Aumento do número de expressão protéica da Cx entre os melânicos (P=0.0477)

5.13 PCR EM TEMPO REAL

Esta técnica permitiu analisar a expressão gênica das conexinas 26 e 43, das metaloproteinases 2 e 9 e da caderina-E a fim de se comparar os melanomas quanto a morfologia e fenótipo. Todo o procedimento foi elaborado conforme padronização e especificação da Applied Biosystems®.

5.13.1 Quantificação da expressão gênica para Cx 26

A análise estatística seguiu os padrões conforme já mencionado no material e métodos (Gráfico 8). Houve diferença estatística quanto ao fenótipo dos melanomas, com aumento da expressão gênica entre os amelanícos ($P = 0.0456$). O Gráfico 8 (B) refere-se a síntese de RNAm para Cx 26 entre os três subtipos morfológicos de melanoma, não havendo diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 8 - Análise da expressão gênica da Cx 26. (A) Aumento no gene da cx 26 entre os amelanícos ($P=0,0456$). (B) Não houve diferença estatística ($P>0,05$)

5.13.2 Quantificação da expressão gênica para Cx 43

A análise estatística seguiu os padrões conforme já mencionado no material e métodos. De acordo com o Gráfico 9, não houve diferença estatisticamente significativa entre o fenótipo e os três subtipos morfológicos de melanoma, quando se quantificou a expressão gênica de Cx 43.

Gráfico 9 - Análise do gene da conexina 43. (A) Não houve diferença estatística entre os melanomas amelanícos e melânicos ($P > 0,05$). (B) Não houve diferença significativa entre os tipos histológicos ($P > 0,05$)

5.13.3 Quantificação da expressão gênica para MMP2

A análise estatística seguiu os padrões conforme já mencionado no material e métodos. O Gráfico 10 refere-se a análise da síntese de MMP2. Quanto ao fenótipo, não houve diferença estatisticamente relevante (Gráfico 10 A), todavia, quando se quantificou a expressão gênica da MMP2 entre os subtipos morfológicos de melanoma, verificou-se menor expressão entre os melanomas mistos ($P = 0,0486$) (Gráfico 10 B).

Gráfico 10 - Análise da expressão do gene da MMP2. (A) Não houve diferença estatística entre os melanomas amelânicos e melânicos ($P>0,05$). (B) Houve baixa expressão gênica de MMP2 entre os os melanomas mistos ($P=0,0486$)

5.13.4 Quantificação da expressão gênica para MMP9

A análise estatística seguiu os padrões conforme já mencionado no material e métodos. De acordo com o Gráfico 11, não foi possível destacar diferença estatisticamente significativa entre o fenótipo (A) e morfologia dos melanomas (B), quando se quantificou a expressão gênica da MMP9.

Gráfico 11 - Análise da expressão do gene da MMP9. (A) Não houve diferença estatística entre os melanomas amelânicos e melânicos ($P>0,05$). (B) Não houve diferença significativa da expressão de MMP2 entre os tipos histológicos ($p>0,05$)

5.13.5 Quantificação da expressão gênica para Caderina-E

Quanto a análise da síntese de caderina-E, embora tenha havido diferença aparente quanto a expressão da caderina-E entre o fenótipo, com diminuição de expressão de caderina-E entre os amelanícos (Gráfico 12 A), não houve diferença significativa, informação que vai de encontro a análise qualitativa da caderina-E (Figura 13 B) que demonstrou menor expressão entre os amelanícos. Todavia, quando se analisou a síntese de caderina-E entre a morfologia dos melanomas, houve uma menor expressão de caderina-E entre o tipo fusiforme (Gráfico 12 B), não havendo diferenças entre os epitelióides e misto.

Gráfico 12 - Análise da síntese do RNAm para caderina-E. (A) Não houve diferença estatística entre os dois grupos melanícos e amelanícos ($P=0,0581$). (B) Quanto a morfologia dos melanomas, houve diminuição da expressão entre os melanomas fusiformes ($P=0,027$), não havendo diferença entre os outros tipos

5 DISCUSSÃO

Em humanos, o melanoma é considerado um dos cânceres mais letais e agressivos da pele (HAASS et al., 2010), no entanto, em cães esta assertiva está relacionada a cavidade bucal (SULAIMON et al., 2002; BERGMAN et al., 2007;), que tem como sua principal característica, o prognóstico reservado. O alto poder de metástase e agressividade, somado a baixa resposta a maioria dos tratamentos e quimioterápicos consagrados, têm sido alvo de excessivos estudos e pesquisas desde as últimas décadas. Estes argumentos nos serviram como base e estímulo na pesquisa de melanomas da cavidade bucal de cães, procurando solidificar alguns conceitos, a fim de contribuir por meio de seus resultados a outras literaturas já consagradas sobre o assunto e principalmente vislumbrar o uso de modelos terapêuticos eficazes no futuro próximo. Para tanto, esta pesquisa utilizou-se exclusivamente de tecidos tumorais caninos *in vivo*, coletados durante o procedimento cirúrgico.

Como já fora abordado anteriormente, a localização dos tumores melanocíticos exerce uma influência direta sobre o prognóstico, contudo, a mesma assertiva não pode ser compartilhada com o tamanho do tumor, fato este que não parece influenciar a sobrevida dos pacientes (SPANGLER; KASS, 2006). Muito embora um crescimento rápido nos permita sugerir um comportamento mais agressivo, em se tratando de melanomas bucais, esta hipótese não parece ser verdadeira, pois na região da boca, o melanoma adota uma postura de extrema agressividade, independentemente de seu tamanho. O fato é que, o tamanho dos melanomas implica diretamente no plano cirúrgico, o que na maioria das vezes exige uma estratégia complexa e radical, com o intuito de buscar margens livres do tumor, na tentativa de aumentar a sobrevida do paciente e protelar o tempo de recidiva.

A epidemiologia é uma ciência importante que deve ser levada em consideração quando se trata da análise de qualquer doença, principalmente do câncer, pois ela nos permite não somente traçar um prognóstico, mas caracterizar o perfil do tumor estudado. Sendo assim, algumas informações aqui obtidas, tais como a não predisposição racial, corroborando com Modiano (1999) que afirmou que a característica racial ainda não está clara. Todavia, este conceito não é universal na literatura, pois alguns autores tais como Camargo (2005) e Perrone (2001), verificaram maior acometimento em cães da raça Schnauzer. Quanto a questão do gênero, o estudo epidemiológico corroborou com Teixeira et al. (2010), que evidenciaram um maior número de cães machos acometidos pelo melanoma, discordando de Miller et al. (2001) que verificaram maior prevalência em fêmeas. No entanto,

encontrado diferenças epidemiológicas que pudessem apontar determinada raça ou sexo com maior predisposição a um determinado fenótipo ou um dos subtipos histológicos de melanomas estudados. Quanto a análise do subtipo histológico, os epitelióides apresentaram-se em maior número, corroborando com Millanta et al. (2002), além de ter havido um aumento de pacientes atendidos com melanoma melânico, corroborando com Teixeira et al. (2010).

Uma das características mais fascinantes e marcantes das células de melanoma, é sua capacidade em produzir melanina, e isto parece contribuir no auxílio do diagnóstico e tratamento adaptativo destes tumores (TAJIMA et al., 1996; MELEO, 1997; HAAS et al.; 2005; HAAS et al., 2006). O que nos chama a atenção, é o fato de que a falta deste pigmento tem cada vez mais intrigado aos estudiosos da área e ao próprio autor deste estudo, pois baseado na análise dos dados clínico-epidemiológicos desta tese, e comparando com outros dados da literatura, é possível sugerir que a falta da melanina signifique um fator contribuinte direto no aumento da agressividade do melanoma tanto em cães (SULAIMON et al., 2002), como no homem (GUALANDRI et al., 2008). Os resultados deste estudo corroboram com pesquisas *in vitro* que utilizaram linhagens celulares amelanocíticas (clone M3) e melanocíticas (clone A4 e A7), isoladas de células de melanomas B16 (linhagem celular F10), a fim de compararem o comportamento entre elas. Deste modo, foi possível demonstrar que as células de melanomas amelanicos apresentaram maior capacidade de metástase (TAJIMA et al., 1996). Choi et al. (2003), após injetarem células de linhagens de melanoma em hamsters, verificaram menor sobrevida entre os animais com melanoma amelanico, quando comparados ao grupo melânico. Estes resultados podem estar associados à baixa síntese ou até mesmo a ausência de melanina.

Até o presente momento, existem muitas suposições e pouco consenso sobre o motivo pelo qual os melanomas amelanicos assumem um comportamento mais agressivo. De acordo com Halaban et al. (2002), a pigmentação é determinada pela atividade de uma enzima tirosinase, considerada uma limitante da síntese de melanina. . Nos melanomas amelanicos, que geralmente se encontram em condições anaeróbias, ocorre a diminuição da síntese de melanina. e como parte da adaptação destas células ao meio ambiente, ocorre aumento da glicólise e conseqüentemente a acidificação extracelular do tecido e mutação dos proto-oncogenes *ras* e *myc*, ativando a enzima V-ATPase, que leva a proliferação descontrolada das células. Esta hipótese, somada aos outros trabalhos mencionados corroboraram com nossos resultados, pois houve um relativo número de animais que desenvolveram melanoma amelanico, com metástases, e menor tempo de sobrevida, após procedimento cirúrgico.

Muito embora, os animais com melanoma amelanico tiveram menor número de metástase (2 animais com acometimento em linfonodos regionais e 1 em linfonodos e pulmão), houve menor número de casos, quando comparados aos melânicos, portanto, acreditamos que se houvesse um número maior, os casos em que animais com melanomas amelanicos com metástase, também seria superior aos animais com melanoma melânico.

Quanto ao subtipo histológico, em nosso estudo, os animais com melanoma misto, apresentaram menor sobrevida, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. De acordo com Modiano (1999) e o tipo histológico, analisado isoladamente, não pode ser levado em consideração para se definir o grau de agressividade entre os melanomas. Para Schulteiss (2006) o tradicional critério histológico para avaliação da malignidade parece ser apropriado, no entanto, deve estar associado a outros fatores.

Associada a questão epidemiológica, a análise das alterações moleculares é de extrema importância, pois as mudanças observadas em células de pacientes com câncer, estão relacionadas, principalmente, aos mecanismos que regulam a divisão celular. Baseado nesta premissa, o primeiro passo a ser evidenciado em nosso estudo, foi o controle da proliferação celular, pois ele pode determinar a agressividade e o risco de um tumor. Sendo assim, nos preocupamos em utilizar dois tipos de avaliações diferentes que visassem a proliferação celular, desde a técnica mais remota, que se baseada na quantificação das células em mitose em HE, passando pela marcação das fases do ciclo tumoral, através da utilização do PCNA, um marcador utilizado na correlação entre o comportamento biológico de certos tipos de tumores tanto no homem (ROELS et al., 1999), como nos cães. A principal escolha deste marcador e não do Ki67 (marcador de todas as fases, do ciclo celular, com maior predominância na fase S do ciclo) e muito utilizado nos dias de hoje, baseou-se na longa duração do PCNA, pois sua marcação se dá na fase G1, com picos na fase S, e permanecendo alta durante as fases G2 e M do ciclo celular (PEÑA et al., 1998), portanto mais específico.

Um segundo passo importante a ser dado, e que contribuiu para o entendimento da proliferação celular foi a análise da apoptose, especificamente com a marcação da Caspase – 3 Clivada, que tem sido foco de vários estudos relacionados aos mecanismos de apoptose, tornando-se peça chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos (VERZIAN et al., 2007). Conforme estudo realizado por Wong et al. (2001) a correlação entre o índice apoptótico e a proliferação celular se mostrou bastante positiva, principalmente em carcinomas mamários, indicando que a apoptose está diretamente relacionada à taxa de proliferação tumoral na tentativa de controlar seu crescimento. Considera-se que caso o índice de apoptose apresente-se alto, o tumor

crece muito lentamente e se estiver baixo, o tumor cresce rapidamente (DUBIN et al., 2000) e isto é explicado porque durante o crescimento tumoral há desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular celular, onde o processo de apoptose esteja envolvido. Sendo assim o alto número de células apoptóticas associado ao alto índice de proliferação celular representam um prognóstico mais desfavorável (DE JONG et al., 2000). Os resultados desta pesquisa não corroboram com esta premissa, pois verificou-se o aumento do índice mitótico e do número de células positivas para PCNA, ou em proliferação e diminuição do número de células em apoptose entre os melanomas amelanicos, que associado aos fatores clínicos e epidemiológicos tais como: menor tempo de evolução tumoral, menor sobrevida, após o procedimento cirúrgico e número de metástases, têm representado um pior prognóstico. Todavia, quando fora realizada a mesma análise com enfoque aos três subtipos histológicos (epitelióide, fusiforme e misto), independentemente do fato de serem amelanicos ou melanicos, não houve diferença estatística quanto ao número de células marcadas para PCNA e Caspase-3. Contudo, este estudo evidenciou um aumento no número de células em mitose entre os melanomas mistos, não havendo diferença entre epitelióide e fusiforme, fato este que discordou de Ramos Vara et al. (2000) que não encontraram diferenças entre o número de células em mitose e os três subtipos de melanoma. No entanto, isto parece ser um fato isolado, pois de acordo com Esplin (2008), o índice mitótico não pode ser utilizado como um fator de prognóstico, embora tenha se encontrado menor tempo de sobrevida pós cirúrgico em animais mais jovens com melanoma misto, ainda sim, fica difícil afirmar que o melanoma misto é mais agressivo que os outros tipos histológicos. Para Roels et al. (1998) não há indícios suficientes para se determinar maior agressividade entre um dos tipos histológicos de melanoma. Uma das sugestões atribuídas a este aumento do índice mitótico entre os melanomas mistos se dá ao fato de que ele se encontra na fase de transição epitelióide – fusiforme, onde está ocorrendo mudanças na morfologia celular, o que pode ser justificado pela desconexão entre duas células, através da perda da caderina-E e consequentemente aumento da mitose.

Após a análise da proliferação celular e apoptose, o terceiro passo a ser abordado foi o papel da caderina-E, que estabelece uma relação harmônica e romântica entre os melanócitos e queratinócitos, levando-os ao equilíbrio. A perda desta molécula de adesão parece ser um dos importantes fatores que levam as células do melanoma a escaparem do controle dos queratinócitos, fazendo com que elas se desprendam do foco primário tumoral e conquiste sua autonomia e auto controle. Ao mesmo tempo em que estas células se soltam do tumor primário em decorrência da diminuição da interação celular, elas têm a capacidade de migrar

e invadir o estroma adjacente. A progressão de tumores sólidos pode ser esquematicamente dividida em três fases fundamentais: Fase 1 (crescimento do tumor primário), Fase 2 (invasão) e Fase 3 (disseminação), com metástases. Estes três estágios podem ser representantes de três diferentes fenótipos das células cancerosas: durante a fase 1, sob uma condição importante de hipóxia, ocorre um crescimento desregulado da célula que propicia as alterações genéticas necessárias a progressão tumoral com inibição da tirosinase e consequentemente ocorrendo a queda de melanina. Na fase dois, as células estão interagindo com as barreiras endoteliais do sangue e vasos linfáticos, o que leva a ruptura das moléculas de adesão, ao aumento na produção de enzimas digestórias da matriz extra-celular (metaloproteinases) e consequentemente ao aumento da mobilidade e progressão tumoral (HAASS et al., 2006; TUCCI et al., 2007; BERX et al., 2009; BONNOMET et al., 2010; GODDE et al., 2010).

Uma vez que as células tumorais alcançam os vasos linfáticos e sanguíneos, figura-se a terceira fase em que ocorre a e a disseminação tumoral e metástase. Estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado que a baixa expressão das caderinas-E entre as células dos melanomas é perfeitamente compreensível, pois esta molécula age como supressor tumoral, uma vez que ela regula importantes passos da invasão e metástase (POSER et al., 2001; MARCK et al., 2005). Sendo assim, sua forte expressão restaura o controle do crescimento do melanócito, via queratinócito e inibe a invasão tumoral (MARCK et al., 2005). Hsu et al. (2000) demonstraram que a baixa regulação da caderina-E leva a perda do controle dos melanócitos pelos queratinócitos e paralelamente a invasão tumoral e ao comportamento agressivo. Todavia, o exato mecanismo pelo o qual isto ocorre, continua incompreensível. Os estudos e afirmações mencionadas corroboraram com esta tese, pois verificou-se diminuição na expressão da caderina-E em todas as amostras tumorais, no entanto, entre os melanomas amelanicos a marcação mais fraca tornou-se evidente. Outro dado interessante, foi a localização aberrante da caderina-E entre os amelanicos e mistos, pois algumas amostras tumorais principalmente deste grupo apresentaram uma marcação citoplasmática, o que também pode sugerir um comportamento equivocado da célula e , aumento de sua agressividade. Esta premissa discorda de Leme et al. (2005) que afirmaram não haver relação estatística entre a perda da expressão da caderina-E e o estadiamento clínico, em tumores humanos.

A fraca marcação da caderina-E não foi corroborada pela análise da síntese gênica, pelo PCR em Tempo Real, pois embora pareça haver uma diminuição do RNAm entre os amelanicos, não houve uma diferença estatisticamente relevante. O que em parte corrobora

com Poiser et al. (2001) que verificaram diminuição da síntese gênica de melanomas, quando comparado aos melanocitomas. É importante ressaltar que este trabalho fez comparações entre tipos de melanomas e não entre melanomas e melanocitomas, talvez por este motivo, algumas alterações não foram tão evidentes. Diferenças aqui não evidenciadas, provavelmente seriam observadas quando comparadas entre tumores melanocíticos malignos e benignos. Neste caso pode-se entender que provavelmente esteja havendo diminuição da síntese de caderina-E entre os melanomas, principalmente entre os amelanícos, mas não o suficiente para se notar uma diferença estatística entre os amelanícos e melanícos. Sendo assim, sugerimos que possa estar ocorrendo tradução e transcrição do RNAm para caderina-E e maior degradação entre os amelanícos, no entanto, haveria a necessidade do aumento do número de amostras e outras análises para se confirmar tal fato. De acordo ainda com o PCR em Tempo Real, houve diminuição da síntese de caderina-E entre os fusiformes, discordando da análise qualitativa que verificou menor intensidade da marcação entre os mistos. Nós ainda acreditamos que esta não seja uma informação relevante pois o número de amostras foi baixo. Para confirmação da diminuição da expressão da caderina-E, não foi possível a realização da técnica de *western blot*, pois as amostras das proteínas apresentavam-se muito heterogêneas, provavelmente por se tratar de um tumor de crescimento rápido, não permitindo assim uma análise fidedigna.

O melanoma é um tumor que depende da interação com estroma, principalmente com a Matriz Extra-Celular (MEX) para invadir o tecido (HAASS et al., 2010), e para que haja migração das células tumorais por estas matrizes celulares é necessário que ocorra degradação do tecido, através de alguns mecanismos, principalmente com participação das enzimas MMP(s) 2 e 9. O real papel destas gelatinases durante a invasão e metástase dos melanomas, assim como em outros tumores têm sido motivo de muitos estudos (HOFMAN et al., 2005), pois até hoje o que se sabe ainda é muito pouco no universo gigantesco que compreende a oncologia. O que se tornou claro através deste estudo, pelo uso da imuno-histoquímica, foi uma intensa marcação dos melanomas amelanícos, que reagiram imuno-fenotipicamente com a MMP2, fato que permite ao autor sugerir que este grupo seja mais agressivo, por apresentar maior atividade invasiva e metastática. Esta hipótese se baseia na literatura de Vasanen et al. (1996), que afirmaram que o aumento na expressão da MMP2 tem sido associado a desordem da arquitetura, à progressão celular e concomitantemente a metástase. Contudo, a análise qualitativa da MMP2 não foi corroborada pela análise quantitativa, pois não houve diferença estatística significativa que justificasse o aumento da marcação entre os amelanícos.

Quanto a análise qualitativa da MMP9 verificou-se maior intensidade na marcação das células positivas entre os melanomas amelanicos, corroborando com alguns autores (TURPEENNIEMI-HUJANEN 2005; VAISANEN et al., 2008), que afirmaram ser esta a principal gelatinase envolvida com os passos da metástase. No entanto, a mesma assertiva não foi corroborada pelos dados estatísticos, não havendo diferença entre o aumento na síntese de MMP9, o fenótipo e tipo morfológico dos melanomas.

A análise quantitativa das MMPs foram corroboradas com a análise da expressão gênica, pela técnica de PCR em Tempo Real, que não demonstrou diferença estatística significativa, quanto a marcação dos melanomas amelanicos para MMP2 e MMP9. Houve porém uma diminuição na expressão gênica para MMP9 entre os melanomas mistos, o que não deve ser levado em consideração pois o número de animais foi irrisório (3 animais). Devido a grande heterogeneidade das amostras protéicas, não foi realizada a técnica de Western Blot para ambas metaloproteinases. Todavia, a análise das MMPs associada aos dados clínicos, epidemiológicos, a proliferação celular e análise qualitativa da caderina-E, somado a assertivas de literaturas consagradas que têm atribuído a forte expressão das MMPs 2 e 9 à agressividade dos melanomas (SCHNAEKER et al., 2004) e de alguns tumores (SIMONETTI et al., 2001), permitiu ao autor desta tese, sugerir mais uma vez que o melanoma amelanico proveniente da cavidade bucal de cães apresenta um comportamento mais agressivo, embora ele reconheça que há necessidade de se confirmar tal afirmação após o uso de outras técnicas moleculares e no aumento do número de amostras.

Os canais de comunicação do tipo *gap* também têm sido alvo de extrema relevância à progressão tumoral e ao mesmo tempo, motivo de discórdia entre diversos autores, pois até a conclusão desta tese, não havia se estabelecido seu exato papel no controle das células tumorais, se estes canais agem na supressão tumoral, inibindo o crescimento dos tumores, ou se simplesmente exercem um papel contraditório, estimulando a proliferação celular. Como já fora abordado anteriormente, na pele saudável, além de exercerem um importante papel na interação melanócito – queratinócito (HSU et al., 2000), as junções *gap* estão diretamente envolvidas com o crescimento, diferenciação e migração dos queratinócitos (PITTS et al., 1988; MESNIL et al., 1995). Todavia, qualquer tipo de alteração que leve a perda de sua função, seja ela uma diminuição da expressão protéica ou a perda da atividade fisiológica, somado a alteração de sua localização (por exemplo aberrante no citoplasma), têm sido associado a vários tipos de cânceres em humanos (YAMASAKI et al., 1996) e a progressão de uma variedade tumoral (MESNIL et al., 2005).

De acordo com Kretz (2004), na pele normal de camundongo, a conexina 26 está localizada somente na camada granulosa e a Cx 43 nas camadas espinhosa e basal da epiderme, sendo que estes achados corroboram com Haass et al. (2006) que verificaram o mesmo na epiderme humana. Estes estudos corroboram parcialmente com esta tese, identificou-se pela técnica de imuno-histoquímica, a localização da Cx43 na camada basal do epitélio saudável de cão, mas o mesmo não ocorreu com a Cx26. Isto é um fato interessante a ser analisado, em estudos futuros, pois em se tratando de um melanócito normal, embora ele não expresse esta conexina, mediante ao processo de transformação e desenvolvimento do melanoma, a mesma célula passa a sintetizar grande quantidade de conexina 26. Sendo que esta confirmação veio através do uso da técnica de imuno-fluorescência indireta, que demonstrou forte marcação da Cx26 entre os melanomas melânicos e uma diminuição da mesma entre os amelanicos, incluindo uma localização citoplasmática, o que sugere perda da comunicação intercelular, invasão e agressividade, quando comparado aos melânicos. Baseado nas assertivas de Kretz et al (2004) e Haass et al. (2006) pode-se sugerir que houve menor síntese da Cx26 entre os melanomas amelanicos e fusiformes, pois se a pele normal não expressa ou sintetiza baixa quantidade de Cx26, significa que o melanoma amelanico a produziu em menor quantidade quando comparado aos melanomas melânicos. Quando se analisa a conexina 43 é possível afirmar que houve uma diminuição na expressão desta proteína entre as células dos melanomas amelanicos e fusiformes, quando comparado aos outros subtipos histológicos e aos melanomas melânicos.

Pode-se tentar entender melhor o papel das conexinas por meio da leitura de outros autores consagrados. Para Saito-katsuragi et al. (2007) as Cx26 estão fortemente expressas em células endoteliais das paredes de vasos sanguíneos ao redor de lesões melanocíticas, sugerindo que os melanomas induzem a expressão destas conexinas através dos vasos endoteliais, pois todas as lesões primárias de melanoma analisadas expressaram Cx26, não sendo identificado porém, a expressão destas conexinas em lesões metastáticas de melanomas. Ito et al. (2000) verificaram um alta expressão de Cx26 em áreas de melanoma invadindo a derme. Segundo, Miura et al. (2007) e Ohba et al. (2007) o aumento da expressão da Cx 26 tem sido responsável pelo aumento espontâneo de metástase em estudos realizados com linhagens de células BL6 de camundongos. De acordo com Ezumi et al. (2008), embora a Cx26 tenha sido considerada um dos membros da família das conexinas responsável pela supressão tumoral, recentes estudos têm associado a alta expressão desta proteína ao pobre prognóstico e diversas malignidades em humanos e principalmente, sua presença tem sido indispensável para metástase espontânea em linhas de células de melanomas. No entanto, o

real papel da Cx26 durante a carcinogênese dos melanócitos e da progressão dos melanomas malignos, ainda permanece obscuro, todavia, esta proteína parece ser supressora da carcinogênese (ITO et al., 2000). Pode-se sugerir, que durante o desenvolvimento do melanoma, inicialmente ocorra uma super-expressão da Cx26, responsável pela invasão tumoral e haja posteriormente uma diminuição desta proteína, tendo-se assim o processo de disseminação do tumor e metástase, ou o terceiro estágio do melanoma. Portanto, no caso dos melanomas amelanicos, caracterizados pela alta agressividade e metástases, já esteja ocorrendo já uma diminuição da Cx26. O interessante é que de acordo com Haass et al. (2010), a Cx26 não é diretamente expressa nas células do melanoma, e sua síntese ocorre durante o processo de desenvolvimento do tumor. Este fato também pode ser associado aos nossos resultados, pois verificou-se baixa marcação para Cx26 entre o melanoma amelanico, sugerindo que este grupo tenha uma rápida disseminação e com isto menor expressão desta conexina.

Alguns autores compartilham da mesma falta de consenso quanto a real função da Cx43 frente ao câncer, pois seu papel ainda é controverso (VILLARES et al., 2009). Estudos têm demonstrado que o gene desta proteína atua como supressor tumoral em várias neoplasias (GOLDBERG et al., 2000; HUANG et al., 2002; CZYS 2008), incluindo as células de melanoma (HAAS et al., 2006; SHEN et al., 2007). Contrariamente, a expressão da Cx43 parece estar elevada em metástases de câncer de mama (VILLARES et al., 2009) e este fato discorda de nossos resultados, pois verificou-se diminuição da expressão da Cx43 entre os melanomas amelanicos, tipo mais agressivo, corroborando com a maioria dos autores mencionados, que atribuem uma função supressora a Cx43. Até os dias de hoje, o papel das conexinas no melanoma permanece obscuro. Estudos *in vitro* têm sugerido que a Cx26 exerça um papel metástico e a Cx43 um papel supressor (SU et al., 2002). Em contra-partida, há de se levar em consideração que este estudo foi realizado *in vivo*, o que conta com diversas variáveis e interferências, principalmente no que se refere à resposta do organismo frente ao tumor. De acordo com os resultados apresentados, pode-se sugerir que ocorra uma relação direta entre a diminuição da expressão das conexinas 26 e 43 e o aumento da proliferação celular. As marcações e localizações das conexinas foram demonstradas pelo uso das técnicas de Imuno-fluorescência Indireta e imuno-histoquímica, e suas expressões nos melanomas foram confirmadas pela técnica de *western blot* (WB). Embora o WB tenha demonstrado diminuição na expressão da conexina 26 entre os melanomas fusiformes, ainda sim, não há dados suficientes que nos permitam sustentar tal resultado, pois as principais alterações entre a morfologia dos melanomas foram observadas entre os melanomas mistos e fusiformes. O

fato de não haver uma resposta padrão, conforme verificado entre os melanomas amelanícos associado ao escasso número de amostras, tornou dificultoso a possibilidade de sustentar a hipótese da existência de um tipo morfológico mais agressivo.

Curiosamente, houve aumento na síntese de RNAm para Cx26 entre os melanomas amelanícos, mas o mesmo não foi verificado entre os subtipos histológicos. O autor da tese sugere que não houve falha durante a transcrição e tradução do gene, no entanto, possa ter ocorrido uma alteração na degradação ou fosforilação da Cx26 e este excesso justifica a localização da conexina 26 no citoplasma ou peri-nuclear, sendo esta hipótese demonstrada na Figura 29. O autor também acredita que o mesmo esteja ocorrendo com a Cx43, pois também houve marcação peri-nuclear, embora não houvesse diferença estatística entre os fenótipos e tipos histológicos. Este aumento de RNAm para Cx26 ainda pode estar relacionado ao fator metastático da proteína, sugerido por outros autores.

Fonte: Solan; Lampe 2007 (com modificações).

Figura 29 - Esquema didático que demonstra o possível caminho da síntese das conexinas e26 e 43 durante o processo de carcinogênese

A perda da expressão da caderina-E, associada à diminuição protéica das Cxs 26; 43 e suas localizações citoplasmáticas aberrantes, associado ao aumento da síntese gênica da Cx26 entre os amelanicos foram demonstradas durante o estudo, e nos permite afirmar que são marcas registradas da progressão tumoral em células melanocíticas tumorais. E não apenas isto, mas a disseminação, cujo início se dá com a interação entre a barreira endotelial, parece ser necessária no estabelecimento de contato célula-célula (por exemplo: caderina-E e JG) entre células cancerosas e endoteliais (PITTS et al., 1988; CRONIER et al., 2009).

O fato de grande discordância entre alguns estudos, deve-se principalmente a metodologia de pesquisa utilizada, pois toda a literatura baseiou-se no estudo com linhagens celulares e pesquisas *in vitro*, o que atribuiu a este estudo um fator de pioneirismo, por trabalhar com melanoma em cães e tecido *in vivo*. E quando se opta por esta metodologia, a pesquisa fica sujeita a diversas circunstâncias atenuantes e interferências do organismo, o que não ocorrem *in vitro*. E isto tem nos servido como estímulo para compreender melhor e buscar respostas e justificativas aos resultados obtidos.

Podemos concluir que as Cx26 e Cx43, a caderina-E, e as MMP-2 e 9 podem ser marcadores interessantes na avaliação do comportamento dos melanomas, ressaltando que o objetivo deste trabalho foi encontrar diferenças entre subtipos dentro de um mesmo tipo de tumor maligno.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto podemos concluir que:

Nas amostras estudadas, constatamos diferenças significantes quanto aos aspectos epidemiológicos, e características moleculares dos melanomas amelânicos, quando comparados aos melânicos da cavidade bucal de cães, as quais atribuem aos melanomas amelânicos um comportamento mais agressivo.

1. Quanto à análise epidemiológica, os cães com menor faixa etária desenvolveram melanoma amelânico e apresentaram uma menor sobrevida após a cirurgia.
2. No geral, cães machos, Sem Raça Definida, com melanomas melânicos e do tipo epitelióide, foram os mais acometidos.
3. Os melanomas amelânicos apresentaram maior proliferação celular, com diminuição da apoptose.
4. O grau de intensidade da marcação para caderina-E foi mais fraco entre os melanomas amelânicos, com localização aberrante ou citoplasmática.
5. Quanto à marcação para as MMPs 2 e 9, houve maior intensidade entre os melanomas amelânicos, não havendo diferenças entre os subtipos histológicos. Quanto à análise quantitativa, não houve diferença entre os fenótipos e tipos histológicos.
6. Quanto à localização das Cxs 26 e 43, houve menor intensidade de marcação entre os melanomas amelânicos.
7. A técnica de Western blot, demonstrou menor expressão de ambas as Cxs entre os amelânicos e fusiformes.
8. Quanto à análise da expressão gênica, houve aumento da Cx26 entre os amelânicos, e não houve diferença estatística entre as morfologias. Cx 43, não houve diferença.
9. Quanto à expressão gênica para MMP2, não houve diferença entre os fenótipos, e baixa expressão entre os mistos. A MMP9, não houve diferença estatística.
10. A análise da expressão gênica para caderina-E, não demonstrou diferença estatística entre os fenótipos, mas houve diminuição da expressão molecular no epitelióide.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, C. K.; FREIDIN, M.; BUKAUSKAS, F.; DOBRENIS, K.; BARGIELLO, T. A.; VERSELIS, V. K.; MICHAEL, V. L.; BENNETT, L. C.; SAHENK, Z. Pathogenesis of X-Linked Charcot Marie Tooth Disease Differential Effects of Two Mutations in Connexin 32. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n.33, p. 10548-10558, 2003.
- AHMED, I. Malignant melanoma: prognostic indicators. **Mayo Clinical Procedure**, v.72, p.:356-361, 1997.
- ANTONY, F. C.; SANCLEMENTE, G.; SHAIKH, H.; TRELLES, A. S.; CALONJE, E. Pigment synthesizing melanoma (so-called animal type melanoma): a clinicopathological study of 14 cases of a poorly known distinctive variant of melanoma. **Histopathology**, v. 48, p: 754 – 762, 2006.
- AVANZO, J. L. **Carcinogenese pulmonar em camundongos portadores de deleção em um dos alelos do gene da Cx 43**: estudo experimental. 2005. 257 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BALCH, C. M.; WILKERSON, J. A.; MURAD, T. M.; SOON, S. J.; INGALLS, A. L.; MADDOX, W. A. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. **Cancer**, v.45, p.3012-3017, 1980.
- BARBOSA, F. A. L. **Efeito da Sinvastatina na modulação da expressão de RECK e suas isoformas em células de melanoma humano**. 2010. 162 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BARNHILL, R. L. **Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma**. USA: Library of Congress, 1995. 294 p.
- BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Practice**, v. 22, p.: 55-60, 2007.
- BERRINGTON, A. J.; JIMBOW, K.; HAINES, D. M. Immunohistochemical detection of melanoma associated antigens on formalin fixed, paraffin embedded canine tumors. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 96-102, 1990.
- BERTHOUD, V. M.; MONTEGNA, E. A.; ATAL, N.; AITHAL, N. H.; BRINK, P. R.; BEYER, E. C. Heteromeric connexons formed by lens connexins, connexin 43 and connexin 56. **European Journal of Cell Biology**, v. 80, n. 22, p. 11-19, 2000.
- BEYER, E. C. Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 4, p. 14439– 14443, 1990.
- BERX, G.; VAN, R. F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, v 1, n. 6, p: 129-142, 2009.

BODE, H. P.; WANG, L.; CASSIO, D.; LEITE, M. F.; ST-PIERRE, M.V.; HIRATA, K.; OKAZAKI, K.; SEARS M. L.; MEDA, P.; NATHANSON, M. H.; DUFOUR, J. F. Expression and regulation of gap junctions in rat cholangiocytes. **Hepatology**, v. 36, p. 631-41, 2002.

BOLON, B.; CALDERWOOD, M. M. B.; HALL, B. J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. **Veterinary Pathology**, v. 27, p. 96-102, 1990.

BONNOMET, A.; BRYSSSE, A.; TACHSIDIS, A.; WALTHAM, M.; THOMPSON, E. W.; POLETTE, M.; GILLES, C. Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7. p. 547-557, 2010.

BRAVO, R.; Cells, J. E. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. **The Journal of Cell and Biology**, v. 84, p.: 795-802, 1980.

BRISSETTE, J. L.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; HALL, J. E.; DOTTO, G. P. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. **Proceedings of National Academy of Science of The United States of America**, v. 91, n. 5, p. 6453–6457, 1994.

BRESLOW, A.: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the Prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of Surgery**, v. 172, p.: 902 - 908, 1970.

BRUZZONE, R.; WHITE, T. W.; SCHERER, S. S.; FISCHBECK, K. H.; PAUL, D. L. Null mutations of connexin 32 in patients with X – linked Charcot – Marie - Tooth disease. **Official Publication of the World Federation of Neurology**, v. 13, n. 4, p. 1253–1260, 1994.

CAMARGO, L. P. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: aspectos clínicos e histopatológicos em 58 casos.2005. 58f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2005.

CAMARGO, L. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; COSTA, P. R. S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 45, n. 2, p. 138-152, 2008.

CHANG, C. C.; TROSKO, J. E.; KUNG, H. J.; BOMBICK, D.; MATSUMURA, F. Potential role of the src gene in inhibition of gap-junctional intercellular communication in NIH-3T3 cells. **Proceedings of National Academy of Science of The United States of America**, v. 82, n. 6, p. 5360-5364, 1985.

CHI-NEU TSAI; CHIA-LUNG TSAI; KA-PO TSE; HWAN-YOU CHANG; YU-SUN CHANG. The Epstein–Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**. v. 99, n. 15, p. 10084 – 10089, 2002.

CHIPMAN, J. K.; MALLY, A.; EDWARDS, G. O. Disruption of gap junction in toxicity and carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v. 71, n. 2, p. 146 - 153, 2003.

-
- CHOI, C.; KUSEWITT, D. F. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 713-718, 2003.
- CLARK, W. H., JR., FROM, L., BERNARDINO, E. A., MIHM, M. C., Jr.: The histogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Research**, v. 29, p.: 705-727, 1969.
- CLEMENTE, C. G.; MIHM, M. C.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S.; COLLINI, P.; CASCINELLI, N. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, v.77, p. 1303-1310, 1996.
- COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological properties of an antibody containing fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**, v. 47, p. 200-202, 1941.
- CRONIER, L.; CRESPI, S.; STRALE, P. O.; DEFAMIE, N.; MESNIL, M. Gap junctions and cancer: new functions for an old story. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.11, n. 2, p.: 323-338, 2009.
- CZYZ, J. The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. **Cellular and Molecular Biology Letter**, v. 13, p.: 92–102, 2008.
- DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. 1 ed.: São Paulo. Roca, 2009. p. 52.
- DAVIES, M. A.; SAMUELS, Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. **Oncogene Review**, p. 1-11.
- DE JONG, J. S.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P .A. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 2, p. 368–373, 2000.
- DERMIETZEL, R.; HWANG, T. K.; SPRAY, D. S. The gap junction family: structure, function and chemistry. **Anatotomy and Embryology**, v. 182, n. 11, p. 517–528, 1990.
- DI, W. L.; RUGG, E. L.; LEIGH, I. M.; KELSELL, D. P. Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 117, p. 958-964, 2001.
- DI NEZZA, L. A.; MISAJON, A.; ZHANG, J.; QUINN, M. A.; OSTOR, A. G.; NIE, G.; LOPATA, A.; SALAMONSEN, L. A. Presence of Active Gelatinases in Endometrial Carcinoma and Correlation of Matrix Metalloproteinase Expression with Increasing Tumor Grade and Invasion. **Cancer**, v. 94, p.: 1466 – 1475, 2002.
- DIEZ, J. A.; AHMAD, S.; EVANS, W. H. Assembly of heteromeric connexons in guinea-pig liver en route to the Golgi apparatus, plasma membrane and gap junctions. **European Journal Biochemistry**, v. 262, n. 1, p. 142– 148, 1999.

DJALILIAN, A. R.; MCGAUGHEY, D.; PATEL, S.; YOUNG-SEO, E. CHENGHUA-YANG; JUN-CHENG; TOMIC, M.; SATRAJIT SINHA, ISHIDA-YAMAMOTO, A.; SEGRE, J. A. Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p.: 1243-1253, 2006.

DUBIN, M.; STOPPANI, A. O. M. Muerte celular programada y apoptosis funcion de las mitocondrias. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 60, p. 375-386, 2000.

EGHBALI, B.; KESSLER, J. A.; REID, L. M.; ROY, C.; SPRAY, D. C. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of cells with connexin 32 cDNA retards growth in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 88, p.:10701-10705, 1991.

ELFGANG, C.; ECKERT, R.; LICHTENBERG-FRATE, H.; BUTTERWECK, A.; TRAUB, O.; KLEIN, R. A.; HULSER, D. F.; WILLECKE, K. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. **Journal of Cell Biology**, v. 129, n. 4, p. 805-817, 1995.

ERREIRA, C. M. M.; MACEIRA, J. M. P.; COELHO, J. M. C. O. Análise imunohistopatológica, clínica e evolutiva dos melanomas. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 72, n. 2, p.: 117-126, 1997.

ESPLIN, D. G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. **Veterinary Pathology**, v. 45, p.: 889 – 896, 2008.

EVANS, W. H.; MARTIN, P. E. Gap junctions: structure and function (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 19, p.: 121-136, 2002.

EZUMI, K.; YAMAMOTO, H.; MURATA, K.; HIGASHIYAMA, M.; DAMDINSUREN, B.; NAKAMURA, Y.; KYO, N.; NGAN, C.Y.; TAKEMASA, I.; IKEDA, M.; SEKIMOTO, M.; MATSUURA, N.; NOJIMA, H.; MONDAN, M. Aberrant Expression of Connexin 26 Is Associated with Lung Metastasis of Colorectal Cancer. **Human Cancer Biology**, v. 14, n. 3, p. 677-684, 2008.

FERREIRA, C. M. M.; MACEIRA, J. M. P; COELHO, J. M. C. O. Análise imunohistopatológica, clínica e evolutiva dos melanomas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, p.: 117 – 126, 1997.

FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, M. D. F.; RIBEIRO, D. M.; COUTINHO, H. D. M. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.

FISHMAN, G. I.; EDDY, R. L.; SHOWS, T. B.; ROSENTHAL, L.; LEINWAND, L. A. The human connexin gene family of gap junction proteins: distinct chromosomal locations but similar structures. **Genomics**, v. 10, p. 250-256, 1991.

FRUEHALF, J. P.; BOSANQUET, A.G. In vitro determination of drugs response: a discussion of clinical application. In: DEVITA, V.T. J. R.; HELLMAN, S.; ROSEMBERG, S. A. (Ed.) **Principles and practice oncology**. 4 ed. Philadelphia: JB Lippincott, 4:1, 1993.

FUKUMARU, K.; YOSHII, N.; KANZAKI, T.; KANEKURA, T. Immunohistochemical comparison of β -catenin expression by human normal epidermis and epidermal tumors. **Journal of Dermatology**; v. 34, p.: 746–753, 2007.

GOLDSCHMIDT, M. H. Pigmented lesions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 12, p. 507 – 514, 1994.

GOLDSCHMIDT, M. H.; SHOFR, F. **Skin tumors of the dog and cat**. New York: Pergamon Press, 1992. 316 p.

GOLDSCHMIDT, M. H.; DUNSTAN, R. W.; STANNARD, A. A.; VON TOSCHARNER, C.; WALDER, E. J.; YAGER, J. A. Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of skin of domestic animals. In: **World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**, 2nd series, volume 3, Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1998.

GOODENOUGH, D. A.; GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Connexins, connexons, and intercellular communication. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 475-502, 1996.

GOODENOUGH, D. A.; PAUL, D. L. Beyond the Gap: Functions of Unpaired Connexon Channels. **Molecular Cell Biology**, Reviews, v. 4, n. 12, p. 1–10, 1972.

GODDE, N. J.; GALEA, R. C.; ELSUM, I. A; HUMBERT, P. O. Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, p.: 174-189, 2010.

GRIFFIN, T. W.; BODGEN, A. E.; REICH, S. D.; ANTONELLI, D.; HUNTER, R. E.; WARD, A.; YU, D. T.; GREENE, H. L.; COSTANZA, M. E. Initial trials of the subrenal capsule assay predictor of tumor response to chemotherapy. **Cancer**, v. 52, n. 12, p.2185 – 2192, 1983.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J. **Veterinary dermatopathology. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease**. Missouri: Mosby – Year Book, 1992. 520 p.

GUALANDRI, L.; BETTI, R.; CROSTI, C. Clinical features of 36 cases of amelanotic melanomas and considerations about the relationship between histologic subtypes and diagnostic delay. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, p.: 283-287, 2008.

GUAN, X.; BONNEY, W. J.; RUCH, R. J. Changes in gap junction permeability, gap junction number and connexin 43 expression in lindane-treated rat liver epithelial cells. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 130, n. 1, p. 79-86, 1995.

- GUERRIER, A.; FONLUPT, P.; MORAND, I.; RABILLOUD, R.; AUDEBET, C.; KRUTOVSKIKH, V.; GROS, D.; ROUSSET, B.; MUNARI-SILEN, Y. Gap junctions and cell polarity: connexin 32 and connexin 43 expressed in polarized thyroid epithelial cells assemble into separate gap junctions, which are located in distinct regions of the lateral plasma membrane domain. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 7, p. 2609–2617, 1995.
- GUILFORD, P. J.; HOPKINS, J. B. W.; GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D.; WILLIS, J.; LYNCH, H.; RAJPUT, A.; WIESNER, G. L.; LINDOR, N. M.; BURGART, L. J.; TORO, T. T.; DON LEE, LIMACHER, J. M.; SHAW, D. W.; FINDLAY, M. P. N.; REEVE, A. E. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. **Human Mutations**, v. 14, p.: 249 – 255, 1999.
- GUSTAFSSON, F.; MIKKELSEN, H. B.; ARENSBAK, B.; THUNEBERG, L.; NEVE, S.; JENSEN, L. J.; NIELS, H.; HOLSTEIN, R. Expression of connexin 37, 40, 43 in rat mesenteric arterioles and resistance arteries. **Histochemistry of Cell Biology**, v. 119, n. 2, p.: 139-148, 2003.
- HAASS, N. K.; RIPPERGER, D.; WLADYKOWSKI, E.; DAWSON, P.; GIMOTY, P. A.; BLOME, C.; FISCHER, F.; SCHMAGE, P.; MOLL, I.; BRANDNER, J. M. Melanoma progression exhibits a significant impact on connexin expression patterns in the epidermal tumor microenvironment. **Histochemistry of Cell Biology**, v. 133, p. 113-124, 2010.
- HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; LI, L.; HERLYN, M.. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**, n. 18, p.150 – 159, 2005.
- HAASS, N. K.; WLADYKOWSKI, E.; KIEF, S., MOLL, I., BRANDNER, J. Differential Induction of Connexins 26 and 30 in Skin Tumors and Their Adjacent Epiderms. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 54, p.: 171-182, 2006.
- HALABAN, R. Pigmentation in melanomas changes manifesting underlying oncogenic and metabolic activities. **Oncology Research**, v.13, n. 1, p.: 3-8, 2002.
- HENNEMANN, H.; DAHL, E.; WHITE, J. B.; SCHWARZ, H. J.; LALLEY, P. A.; CHANG, S.; NICHOLSON, B. J.; WILLECKE, K. Two gap junction genes, connexin 31.1 and 30.3, are closely linked on mouse chromosome 4 and preferentially expressed in skin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 17225 – 17233, 1992.
- HERTZBERG, E. L.; SKIBBENS, R. V. A protein homologous to the 27,000 dalton liver gap junction protein is present in a wide variety of species and tissue. **Cell**, v. 39, n. 4, p. 61–69, 1984.
- HEYNKES, R.; KOZJEK, G.; TRAUB, O.; WILLECKE, K. Identification of rat liver Cdna and Mrna coding for the 28 kDa gap junction protein. **FEBS Letters**, v. 205, n. 1, p. 56– 60, 1986.
- HIROHASHI, S. Inactivation of the E-Cadherin mediated cell adhesion system in human cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 56, p.: 1782 – 1791, 1998.

HOFFMAN, U. B.; HOUBEN, R.; BROCKER, E-B.; BECKER, J. C. Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, p. 307-314, 2007.

HOUSE, A. K.; CATCHPOLE, B.; GREGORY, S. P. Matrix metalloproteinase mRNA expression in canine anal furunculosis lesions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 68 – 75, 2007.

HSU, MEI-YU; ANDL, T.; LI, G.; MEINKOTH, J.L.; HERLYN, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 1535-1542, 2000.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and Unlabeled antibody (PAP) procedure. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HUANG, R.; LIN, Y.; WANG, C. C.; GANO, J.; LIN, B.; SHI, Q.; BOYNTON, A.; BURKE, J.; HUANG, R.-P. Connexin 43 Suppresses Human Glioblastoma Cell Growth by Down-Regulation of Monocyte Chemotactic Protein 1, as Discovered Using Protein Array Technology. **Cancer Research**, v. 62, p.: 2806-2812, 2002.

ITO, A.; KATOH, F.; KATAOKA, T. R.. A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. **Journal of Clinical Investigative**, v. 105, p.: 1189 – 1197, 2000.

ITO, A.; MORITA, N.; MIURA, D.; KOMA, Y-I.; KATAOKA, T. R.; KITAMURA, Y.; KITA, Y.; NOJIMA, H. A derivate of oleamide potently inhibits the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 10, p. 2015-2022, 2004.

Intercellular – Calcium- Mediated Cell Signaling in Keratinocytes Cultured from Patients with NF1 or Psoriasis. Chapter 2. Review of the literature. Disponível em <herkules.oulu.fi/.../html/i1002636.html>. Acesso em 03 de Fevereiro de 2009.

IYENGAR, B. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA): proliferative phase functions and malignant transformation of melanocytes. **Melanoma Research**, v. 5, n. 2, p. 293-295, 1994.

JIANG, J. X.; PAUL, D. L.; GOODENOUGH, D. A. Posttranslational phosphorylation of lens fiber Cx46: a slow occurrence. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 34, n. 4, p. 3558–3565, 1993.

JOHNSON, J. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 18, p.: 345 – 357, 1999.

JUNG, J. E. **Avaliação Imunoistoquímica dos marcadores de progressão tumoral E-Caderina, β -Catenina, CEACAN-1 e PTEN em melanoma cutâneo**. 2008. 154 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

-
- KAMMERER, U.; KAPP, M.; GASSEL, A.M.; RITCHER, T.; TANK, C.; DIETL, J.; RUCK, P. A new rapid immunohistochemical staining technique using the Envision antibody complex. **The Histochemical Society**, v. 49, n. 5, p. 623-630, 2001.
- KAMIBAYASHI Y.; OYAMADA, Y.; MORI, M., OYAMADA, M.. Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis *in vivo*. **Carcinogenesis**, v. 16, p.1287-1297, 1995.
- KANO, Y.; LOEWENSTEIN, W. R. Intercellular diffusion. **Science**, Amsterdam, v. 143, n. 11, p. 959- 960, 1964.
- KELSELL D. P.;, DUNLOP J.; STEVENS H. P.; LENCH N. J.; LIANG J. N.; PARRY G.; MUELLER R. F.; LEIGH I. M. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensor neural deafness. **Nature**, v. 387, p.:80–83, 1997.
- KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, p. 629-640, 1997.
- KOENIG, A.; WOJCIESZYN, J.; WEEKS, B.R.; MODIANO, J.F. Expression of S100, Vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in seven canine melanoma cells line and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. **Veterinary Pathology**. v. 38; p. 427-435, 2001.
- KOJIMA, T.; SPRAY, D. C; KOKAI, Y.; CHIBA, H.; MOCHIZUKI, Y.; SAWADA, N. Cx 32 Formation and/or Cx 32 – Mediated Intercellular Communication Induces Expression and Function of Tight Junctions in Hepatocytic Cell Line. **Experimental Cell Research**, v. 276, p. 40 – 51, 2002.
- KRETZ, M.; MAASS, K.; WILLECKE, K. Expression and function of connexins in the epidermis, analyzed with transgenic mouse mutants. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, p. 647 – 654, 2004.
- KRUTOVSKIKH, V.; YAMASAKI, H. Role of gap junctional intercellular communication disorders in experimental and human carcinogenesis. **Histology and Histopathology**, v. 12: p.761-768, 1997.
- KUMAR, N. M.; GILULA, N. B. The Gap Junction Communication Channel. **Cell**, California, USA,v. 84, p. 381 – 388, 1996.
- LEE, J. T.; HERLYN, M. Old disease, new culprit: tumor stem cells in cancer **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 3,: p.: 603-9, 2007.
- LEME, M. B. P.; WAITZBERG, A. F. L.; ARTIGIANI, R.; MATOS, D. The relationship of E-cadherin with colorectal adenocarcinoma prognosis. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões**, v.32, n.4 p.1564 – 1573, 2005.
- LERNER, D. L.; YAMADA, K. A.; SCHUESSLER, R. B.; SAFFITZ, J. E. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmias induced by ischemia in Cx 43 deficient mice. **Circulation**, v. 8, n. 5, p. 547-552, 2000.

-
- LEWIS ZHICHANG SHI; WEI ZHENG. Establishment of an in vitro brain barrier epithelial transport system for pharmacological and toxicological study. **Brain Research**, v.1057, p. 37 – 48, 2005.
- LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Dynamics of cell interactions and communications during Melanoma Development. **Critical Review Oral Biology Medicine**, v. 13, n.1 p. 62-70, 2002.
- LIOTTA, L. A.; STEEG, P. S.; STETLER-STEVENSON, W. G.. Cancer metastasis and angiogenesis: an balance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-36, 1991.
- LOEWENSTEIN, W. R.; KANNO, Y. Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. **Nature**, v. 209, p. 1248-1249, 1966.
- LOUKOPOULOS, P.; MUNRALL, B. A.; STRAW, R. C.; THORNTON, J. R.; ROBINSON, W. F. Matrix Metalloproteinase-2 and – 9 involment in canine tumors. **Veterinary Pathology**, v. 40, p.: 382 – 394, 2003.
- MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. They're not just for matrix anymorew! **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, p. 534-540, 2001.
- MACEWEEN, E. G. Tumors miscellaneos. In: WITHROW, S. J.; MACEWEEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 3. ed. Philadephia: Saunders, 2001. cap. 29, p. 639 – 646.
- MAKOWSKI, L.; CASPAR, D. L. D.; PHILLIPS, W. C., GOODENOUGH, D. A. Gap junction structures. II, analysis of the X- ray diffraction data. **The Journal of Cell Biology**., v. 74, p. 629 – 645, 1977.
- MARCK, V. V.; STOVE, C.; BOSSCHE, K. V. D.; SOTVE, V.; PAREDES, J.; HAEGHEN, Y. V.; BRACKE, M. P. Cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in Human Melanoma. **Cancer Research**, v. 65, n. 19, p. 8774 – 8783, 2005.
- MARCONATO, F.; BOARO, E.; WITZ, M. I.; BAJA, K. G.; PINTO, V. M. Mandibulectomia em cães – avaliação retrospectiva de seis casos. Trabalho apresentado no **37º COMBRAVET**, Gramado – Rio Grande do Sul, 2008.
- MARINS, M. **Junções comunicantes e migração celular em explantes de zona suventricular pós natal de roedores**. 2008. 137f. (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008
- MARINO, D. J.; MATTHIESEN, D. T.; STEFANACCI, J. D.; MOROFF, S. D. Evaluation of dogs with digits masses: 117 cases. **Journal Am Veterinary Medicine Association**, v. 207, p.: 726 – 728, 1995.
- MARQUES, M. E. A.; YAMASHITA, T.; MARQUES, S. A.; NAI, G. A. Melanoma tipo animal: relato de dois casos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 4, p.: 323 – 328, 2010

-
- MASUDA, M.; USAMI, S.; YAMAZAKI, K.; TAKUMI, Y.; SHINKAWA, H.; KURASHIMA, K.; KUNISHIRO, T.; KANZAKI, J. Connexin 26 distribution in gap junctions between melanocytes in the human vestibular dark cell area. **The Anatomical Record**, v. 262, n. 2, p: 137-46, 2001.
- MASUDA, M.; YAMAZAKI, K.; TOYAMA, Y.; KANZAKI, J.; HOSODA, Y. Ultrastructural recognition of gap junctions between melanocytes in human vestibular organs by tannic acid containing fixative preparation and freeze-fracture technique. **The Anatomical Record**, v. 246, p.: 8–14, 1996.
- MELEO, K. A. Tumors of the skin and associated structures. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 27, n.1, p. 73-94, 1997.
- MESNIL M.; KRUTOVSKIH, V.; PICCOLI, C.; ELFGANG, C.; TRAUB, O.; WILLECKE, K.; YAMASAKI, H. Negative growth control of HeLa cells by connexin genes : connexin species specificity. **Cancer Research**. v. 55 p. 629-639, 1995.
- MESNIL, M.; CRESPI, S.; AVANZO, J.L.; Zaidan-Dagli, M.L. Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1719, n. 1-2. p.: 125-45, 2005.
- MIHM, M. C.; JR, M. D.; WALLACE, H.; CLARK, M. D.; LYNN – FROM, M. D. The Clinical Diagnosis, Classification and Histogenetic Concepts of the Early Stages of Cutaneous Malignant Melanomas. **The New England Journal of Medicine**, v. 284, p.: 1078 – 1082, 1971.
- 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 behavior. **Research in Veterinary Science**, v. 73, p.: 45 – 51, 2002.
- MIURA, D.; KIDA, Y.; NOJIMA, H. Camellia oil and its distillate fractions effectively inhibit the spontaneous metastasis of mouse melanoma BL6 cells. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2541-2548, 2007.
- MODIANO, J. F.; RITT M. G.; WOJCIESZYN, J. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. **Journal of Veterinary International Medicine**, v. 13, p.: 163-174, 1999.
- MONAGHAN, P., MOSS, D. Connexin expression and gap junctions in the mammary gland. **Cell Biology International**, v. 2, p. 121-125, 1996. Supplement 2.
- MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**. 2 ed. England: University of California Press, 1978. 204 p.
- MULLER, R. M.; SCOTT, D. W.; GRIFFIN, C. . **Muller and Kirk's small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 1528p.

MULLIGAN, R. M. Neoplastic disease of dogs. Neoplasms of melanin forming cells. **American Journal of Pathology**, v. 25, p. 339 – 355, 1949.

MUNARI-SILEM, Y.; ROUSSET, B. Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands-molecular and functional aspects: a review. **European Journal of Endocrinology**, v. 135, n. 3, p. 251 – 264, 1996.

NAKAICHI, M.; YUNUKI, T.; OKUDA, M.; UNE, S.; TAURA, Y. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 271 – 279, 2007.

NIKKOLA, J.; VIHINEN, P.; SISKOVITIORISTO, M.; LEHTINEN, K.; KAHARI, V. M.; PYHONEN, S. High serum level of matrix metalloproteinases-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 14, p.: 5158 – 5166, 2005.

NGUYEN, M.; ARKELL, J.; JACKSON, C. J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v.33; p.: 960 – 970, 2001.

NOLLET, F., KOOLS, P. and VAN ROY, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **Journal. Molecular Biology**, v. 299, p.: 551-572, 2000.

OHBA, Y.; KANAO, Y.; MORITA, N.; FUJII, E.; HOHRAI, M.; TAKATSUJI, M.; HIROSE, H.; MIURA, K.; WATARI, A.; YUTSUDO, M.; ZHAO, H.; YABAKUTA, N.; ITO, A.; KITA, Y.; NOJIMA, H. Oleamide derivates suppress the spontaneous metastasis by inhibiting connexin 26. **International Journal of Cancer**, v. 121, p.: 47-54, 2007.

PARK, K.; LEE, Y. D.; PARK, H. J.; CHUN, Y. M. Epithelial differentiation in developing murine eustachian tube and middle ear. **The Journal of American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 122, n. 6, p.: 902 – 907, 2000.

PARKER, C.; RAMPAUL, R. S.; PINDER, J. A.; BELL, J. A.; WENCYK, P. M.; BLAMEY, R. W.; NICHOLSON, R.I.; ROBERTSON, J. F. R. E-cadherin as an prognostic indicator in primary breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 12, p.: 1958–1963, 2001.

PAUL, D. L. Molecular cloning of cDNA from rat liver gap junction protein. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 4, p. 123– 134, 1986.

PEINADO, H.; PORTILLO, F.; CANO, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **International Journal of Developmental Biology**, v. 48, p. 365-375, 2004.

PEÑA, L. L.; NIETO, A. I.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mamary tumors: relation ship to clinical and pathologic variables. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10: p. 237-246, 1998.

- PERRONE, E.A. **Análise histological, imuno-histoquímica e da proliferação celular de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas, estudo retrospectivo.** 2001, 128f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- PIECHOCKI, M. P.; BURK, ROBERT D.; RUCH, R. J. Regulation of connexin 32 and connexin 43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 3, p. 401– 406, 1999.
- PITTS, J. D.; FINBOW, M. E.; KAM, E. Junctional communication and cellular differentiation. **British Journal of Cancer Supplement**, v. 9, p.: 52-57, 1988.
- POSER, I.; DOMINGUEZ, D.; HERREROS, A. G.; VARNAL, A.; BUETTNER, R.; BOSSERHOFF, A. K. Loss of E-cadherin Expression in Melanoma Cells Involves Up-regulation of the Transcriptional Repressor Snail. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, n. 27, p. 24661–24666, 2001.
- PROULX, D. R.; RUSLANDER, D. M.; DODGE, R. K.; HAUCK, M. L.; WILLIAMS, L. E.; HORN, B.; PREICE, G.S .; THRALL, D. E. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Radiotherapy of Oral Melanoma Dogs**. v. 44, n. 3, p. 352 – 359, 2003
- QUEIROZ, G. F.; MATERA, J.M .; DAGLI, M. L. Z .D.; TORRES, L. N. Utilização da crioterapia no tratamento de sarcoma de tecidos moles de extremidades em cães. SIMPÓSIO DE ONCOLOGIA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 10. 2004, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: USP, 2004. CD-ROM.
- 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, p.: 597-608, 2000.
- RIBEIRO, R. I. A.; JUNIOR, P. C. B.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Journal of Brazilian Pathology Medicine Laboratory**, v. 44, n. 2, p. 115-121, 2008.
- REISS, M. L. V. Revisão das metaloproteinases envolvidas em processos tumorais. **Centro Municipal de Saúde Américo Veloso**, Rio de Janeiro, 2002.
- ROSE, B.; METHA, P. P.; LOEWENSTEIN, W. R. Gap-junction protein gene suppresses tumorigenicity. **Carcinogenesis**, v. 14, :, p. 1073-1075, 1993. Supplement 5
- RUCH, R. J. The role of *gap* junctional intercellular communication in neoplasia. **Annals of Clinical and Laboratory Sciences**, v. 24 p. 216-31, 1994.
- SAEZ, J. C.; BERTHOUD, V. M.; BRANES, M. C.; MARTINEZ, A. D; BEYER, E.C. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. **American Physiological Society**, v.10, n. 4, p. 1359–1400, 2003.

SAITO-KATSURAGI, M.; ASADA, H.; KATOH, F.; MASUZAWA, M.; TSUTSUMI, M.; KUNIYASU, H.; ITO, A.; NOJIMA, H.; MIYAGAWA, S. Role for Connexin 26 in metastasis of human malignant melanoma. **Cancer**. v.. 1; n. 5, p. 1162-1172, 2007.

⟨saude-joni.blogspot.com⟩ Acessado dia 17 de Julho de 2010.

SCHNAEKER, E. M.; OSSIG, R.; LUDWIG, T.; DREIER, R.; OBERLEITHNER, H.; WILHELMI, M.; SCHNEIDER, S. W. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinases-9 exocytosis. **Cancer Research**, v. 64, p. 8924 – 8931, 2004.

SCHULTHEISS, P. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal Veterinary of Diagnostic Investigative**, v. 18, p.: 422 – 425, 2006.

SCOTT, D. W.; YAGER, J. A. The skin and appendages. In: JUBB, K. V. F.; PALMER, B. **Pathology of domestic animals**. 4 ed. San Diego, California: Academic Press, 1993. v.1.

SCOTT, D.W; MILLER, W.Y. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001.1528 p.

SHEN, Y.; KHSIAL, P. R.; LI, X. SRC utilizes cas to block gap junctional communication mediated by connexin 43. **The Journal of Biochemistry Chemistry**, v. 282, p.: 914–21, 2007.

SHIMA, I.; SASAGURI, Y.; KUSUKAWA, J.; YAMANA, H.; FUJITA, H.; KAKEGAWA, T. Production of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-3 related to malignant behavior of esophageal carcinoma. **Cancer**, v. 70, p.: 2747 – 2753, 1992.

SHINGLETON, W. D.; HODGES, D. J.; BRICK, P.; CAWSTON, T. E Collagenase a key enzyme in collagen turnover. **Biochemistry of Cell Biology** v. 74, n. 6, p. 759 – 775, 1996.

SIMONETTI, O.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; NITA, P.; BERNARDINI, M.L.; BIAGINI, G.; OFFIDANI, A. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 in cutaneous melanocytic lesions. **Cancer**, v. 95; n.9, p. 602 – 624, 2002.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of Melanocytic Neoplasms. **Veterinary Pathology**. n.39. p. 651 – 678, 2002.

SMOECKEL, C.; BOCKELBRINK, A.; BOCKELBRINK, H.; BRAUN-FALCO, O. Low and high risk malignant melanoma and multivariate analyses for prognostic classification. **European Journal of Cancer et Clinical Oncology**. v. 19, n. 2, p.: 237-243, 1983.

SOLAN, J. L.; LAMPE, P. D. Key Connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junctions life cycle. **Journal of Membrane Biology**, v. 217, n. 1 – 3, p.: 35 – 41, 2007.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F. BARROS, C. S. L. Retrospective study on 761 canine skin tumors. **Ciência Rural**, v. 36, n.2, p. 555-560, 2006.

-
- SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and Epidemiologic Bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary Pathology**, v. 43, p: 136-149, 2006.
- SU, Y. A.; BITTNER, M. L.; CHEN, Y.; TAO, L.; JIANG, Y.; ZHANG, Y.; STEPHAN, D. A. Identification of tumor-supressor genes using human melanoma cells lines UACC903, UACC903 (+) and SRS3 by comparison of expression profiles. **Molecular Carcinogenesis**. v.28, p.: 119-127, 2002.
- SULAIMON, S. S .; KITCHELL, B. E.; EHRHART, E. J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal Comparative Pathology**. v. 127, p. 162-168, 2002.
- TAJIMA, S.; URA-ISHIKO, A.; HAYASHI, A. Melanogenesis, biosynthetic phenotype of fibronectin and collagen, and migrating activity in cloned B16 mouse melanoma cells. **Journal of Dermatological Science**, v.12, p.: 24-30, 1996.
- TANG, L.; HUNG, C. P.; SCHUMAN, E. M. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. **Neuron** ,v. 20, p.: 1165 – 1175, 1998.
- TEIXEIRA, T. F. Influência da expressão da conexina 43 em modelo de hiperplasia de ductos biliares, após a ligação do ducto biliar comum (colédoco) em camundongos com deleção em um dos alelos para o gene da conexina 43. 2003. (Dissertação). Disponível em <lab.univ-poitiers.fr/ipbc/FR/ICC/def -cxine.htm>. Acessado em 28 de Janeiro de 2010.
- TEIXEIRA, T. F.; SILVA, T. C.; COGLIATI, B.; NAGAMINE, M. K.; DAGLI, M. L .Z. Retrospective study of melanocytic in dogs and cats. **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v.3, n.2, p:100-104, 2010.
- TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A. P. C.; PEREIRA, R. S.; PAVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; COELHO, J. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, v. 44, n. 2, p. 96-102, 2007
- TORRES, L. N.; MATERA, J. M.; VASCONCELLOS, C. H.; AVANZO, J. L.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; DAGLI, M. L. Z. Expression of connexins 26 and 43 in canine hyperplastic and neoplastic mammary glands. **Veterinary Pathology**. v.42, p. 633-641, 2005.
- TROSKO, J. E.; CHANG, C. C.; MADHUKAR, B. V.; KLAUNIG, J. E. Chemical, oncogene and growth factor inhibition of gap junctional intercellular communication: an integrative hypothesis of carcinogenesis. **Pathobiology**, v. 58: p. 265-278, 1990.
- TUCCI, M. G.; LUCARINI, G.; BRANCORSINI, D.; ZIZZI, A.; PUGNALONI, A.; GIACCHETTI, A.; RICOTTI, G.; BIAGINI, G. Involvement of E-cadherin, β -catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 1212 – 1216, 2007.
- TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie**, v. 87, p. 287-297, 2005.

-
- UNGER, V. M.; KUMAR, N. M.; GILULA, N. B.; YEAGER, M. Three dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. **Science**, v. 283, p. 1176 – 1180, 1999.
- URIA, J. A.; STAHL-BACKDAHL, M.; SEIEKI, M.; FUEYO, A.; LÓPEZ-OTÍN, C. Regulation of collagenase-3 expression in human breast carcinomas is mediated by stromal epithelial cell interactions. **Cancer Research**, v. 57, p. 4882-4888, 1997.
- VAISANEN, A.; KALLIOINEN, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Comparison of the prognostic value of matrix metalloproteinases 2 and 9 in cutaneous melanoma. **Human Pathology**, v. 39, p.: 377-385, 2008.
- VAISANEN, A.; TUOMINEN, H.; KALLIOINEN, M.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Matrix metalloproteinase-2 (72kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value,. **Journal Pathology**, v. 180, p. 283-289, 1996.
- VEENSTRA, R. D.; WANG, H. Z.; BEBLO, D. A.; CHILTON, M. G.; HARRIS, A. L.; BEYER, E. C.; BRINK, P. R. Selectivity of connexin specific gap junctions does not correlate with channel conductance. **Circulation Research**, v. 77, n. 6, p. 1156–1165, 1995.
- VERNON, S. W.; TILLEY, B. C.; NEALE, A. V.; STEINFELDT, L. Ethnicity survival and delay in seeking treatment for symptoms of breast cancer. **Cancer**, v. 55, n. 7, p.1563 – 1571, 1985.
- VILLARES, G. J.; DOBROFF, A. S.; WANG, H.; ZIGLER, M.; MELNIKOVA, V. O.; HUANG, L.; BAR-ELI, M. Overexpression of protease –activated receptor -1 contributes to melanoma metastasis via regulation of connexin 43. **Cancer Research**, v. 15, n. 16, p.: 6730 – 6737, 2009.
- WILLECKE, K.; JUNGBLUTH, S.; DAHL, E.; HENNEMANN, H.; HEYNKES, R.; GRZESCHIK, K. H. Six genes of the human connexin gene family coding for gap junctional proteins are assigned to four different human chromosomes. **European Journal of Cell Biology**, v. 53, n. 2, p. 275–280, 1990.
- WOESSNER, J. Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelin. **Faseb Journal**; v. 5, p.: 2145 – 2154, 1991.
- WOLF, C.; CHENERD, M. P.; DURAN DE GROSSUVRE, P.; BELLOCQ, J. P.; CHAMBON, P.; BASSET, P. Breast cancer associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, p.: 870 – 872, 1992.
- WONG, S. C. C. Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. **Journal of Pathology**, v. 194, p. 35-42, 2001.
- WOILINA, U.; HIPLER, U. C.; KNOLL, B.; GRAEFE, T.; KAATZ, M.; KIRSCH, K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 127, p.: 631 -35, 2001.

REFERÊNCIAS

YAMASAKI H., NAUS C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v.17, n. 6, p.1199 - 213, 1996.

WOOSLEY, J. T.; DETRICH, D. R. Prognostic significance of PCNA grade in malignant melanoma. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, n.6, p.498-503, 1993.

YAMASAKI, H. Gap junction intercellular communication and carciogenesis. **Carciogenesis**, v.17, n. 7, p.1051-1058, 1990.

YAMASAKI, H.; NAUS, C. Role of connexin genes in growth control. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 6, p. 1199-1213, 1996.

YAMASAKI, H.; KRUTOVSKIKH, V.; MESNIL, M.; TANAKA, T., DAGLI, M.L.Z.; OMORI Y. Role of conexina (*gap* junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. **Comptes Rendus de l'Academie de Sciences de Paris**, v. 322, p.151-159, 1999.

ZBYTEK, B.; CARLSON, J. A.; GRANESE, J.; ROSS, J.; MIHM, M. C. J.; SLOMINSKI, A. Melanoma occurrence, staging and detection. **Expert Review of Dermatology**, v. 3, n. 5, p.: 569–585, 2008.

ZHANG, Y. W.; KANEDA, M.; MORITA, I. The gap junction-independent tumor suppressing effect of connexin 43. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 378, n. 45, p. 44852-44856, 2003.

.