EDUARDO PERLMANN

**Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em
cães**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros

São Paulo

2015

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.3097
FMVZ

Perlmann, Eduardo
Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em cães / Eduardo Perlmann. -
- 2015.
72 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros.

1. Melanoma. 2. Imunoistoquímica. 3. Úvea. 5. Cães. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em cães”, protocolado sob o nº 2245/2011, utilizando olhos de cães emblocados em parafina, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research “Immunohistochemistry study of the uveal melanocytic neoplasias in dogs”, protocol number 2245/2011, utilizing eyes of dogs embedded in paraffin, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Sérgio de Moraes Barros, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PERLMANN, Eduardo

Título: Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica Veterinária 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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico essa tese a minha família
que está sempre comigo
e tornou tudo isso possível*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Sergio de Moraes Barros**, sou muito grato pelas oportunidades proporcionadas, pela confiança e orientação.

À Dra. **Angélica de Mendonça Vaz Safatle** pela amizade e ensinamentos por todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Miguel N. Burnier Jr**, pela enorme contribuição no presente trabalho e pela oportunidade dada de participar da equipe do Laboratório de Patologia Ocular da Universidade McGill.

À toda equipe do Laboratório de Patologia Ocular da Universidade McGill, pela ajuda e contribuição no presente trabalho.

À Dra. **Ana Beatriz Toledo Dias Madalena, Pablo Zoroquiain, Erin Mayo-Goldberg, Emilia Antecka e Tiffany Porraccio**, pela importante contribuição no presente trabalho.

Aos meus amigos e colegas de pós graduação, **Michelle Barbosa, Ana Carolina Góes, Ana Paula Hvenegaard, Flavio Roncatti, Ana Eyherabide e Pamela Juarez Dongo**, pela amizade e cooperação mútua nesses anos de convivência.

Aos colaboradores do Setor de Oftalmologia da FMVZ USP, **Luciana Soares Abranches, Emily Rodrigues, Aline Ceschin e Ricardo Pecora**, pela convivência e amizade.

À **Profa. Aline Adriana Bolzan** pelo convívio e amizade.

À **Profa. Dra. Maria Cristina Martins e Prof. Dra. Marcia Lowen** pelos ensinamentos que me possibilitaram entender melhor a Patologia Ocular.

Ao **Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira**, da Universidade Federal do Paraná, pelo entusiasmo pela Patologia Ocular e contribuição no presente trabalho.

Aos secretários do Departamento de Clínica Cirúrgica da FMVZ USP, **Lívia** e **Ney**, pela paciência e ajuda nas horas mais importantes.

A todos meus colegas veterinários que me enviaram os olhos e confiaram no meu trabalho.

À **Elza**, da biblioteca da FMVZ USP pela ajuda e paciência.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

RESUMO

PERLMANN, E. **Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em cães.** [Immunohistochemical study of the uveal melanocytic neoplasias in dogs]. 2015. 72 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os melanomas possuem diferentes comportamentos entre as espécies, sendo de grande importância a caracterização do mecanismo molecular que influencia tal diversidade comportamental. Objetivou-se neste estudo avaliar as características moleculares das neoplasias melanocíticas uveais em cães, a fim de compreender as diferenças entre o melanoma uveal humano e o canino. Foram utilizados 64 olhos de 64 cães com diagnóstico de neoplasia intraocular primária de origem melanocítica. Com base nos critérios histopatológicos estabelecidos foram diagnosticados 37 melanocitomas e 27 melanomas. Não houve predominância sexual e cães sem raça definida, Labrador Retriever e Cocker Spaniel Inglês foram os mais acometidos. Foram analisadas características morfológicas, taxa de mitose, grau de pigmentação, presença de extensão extraocular, localização, infiltrado inflamatório, *loop* vascular e necrose. Foi realizada análise imunoistoquímica avaliando os marcadores Melan-A, HMB-45, Ki-67 e COX-2. O Melan-A mostrou ser mais sensível, sendo expresso em 53,1% dos casos, enquanto o HMB-45 foi positivo em apenas 31,2% dos casos. O Melan-A e o HMB-45 foram menos frequentes nos melanocitomas comparado com os melanomas. Em 23 casos, nenhum dos dois marcadores reagiu. Os resultados do marcador de proliferação Ki-67 revelaram maior positividade entre os melanomas, com média do índice Ki-67 de 37,8%, enquanto a média dos melanocitomas foi de 15%. Não houve diferença estatística da marcação do Ki-67 com os tipos celulares dentre os melanomas. A COX-2 reagiu positivamente na maioria dos casos e não foi observada diferença estatística entre melanocitomas e melanomas. Dentre os melanomas não houve diferença estatística entre os tipos celulares para a marcação da COX-2. Os achados aqui discutidos revelam interessantes diferenças e similaridades entre as neoplasias melanocíticas uveais no homem e no cão.

Palavras-chave: Melanoma. Imunoistoquímica. Úvea. Cães.

ABSTRACT

PERLMANN, E. **Immunohistochemical study of the uveal melanocytic neoplasias in dogs.** [Estudo imunoistoquímico das neoplasias melanocíticas uveais em cães]. 2015. 72 f. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Melanomas have different behavior between species and is of great importance to characterize the molecular mechanism influencing this behavioral diversity. The objective of this study was to evaluate the molecular characteristics of uveal melanocytic neoplasias in dogs, in order to understand the differences between uveal melanoma in humans and dogs. Sixty-four eyes of 64 dogs diagnosed with primary intraocular neoplasia of melanocytic origin were studied. Based on the established histopathological criteria 37 melanocytomas and 27 melanomas were diagnosed. There was no sexual predominance and mixed breed dogs, Labrador Retriever and English Cocker Spaniel were the most affected. Morphological features, mitotic rate, degree of pigmentation, presence of extraocular extension, location, inflammatory infiltrate, vascular loop and necrosis were analyzed. Immunohistochemical analysis was performed to evaluate markers such as Melan-A, HMB-45, Ki-67 and COX-2. The Melan-A was more sensitive and expressed in 53.1% of cases, while the HMB-45 was positive in only 31.2%. The Melan-A, and HMB-45 were less frequent in melanocytomas compared to melanomas. In 23 cases, neither markers reacted. The results of the Ki-67 showed higher positivity among melanomas, mean Ki-67 index of 37.8%, while melanocytomas showed mean of 15%. There was no statistical difference in the Ki-67 labeling among melanoma's cell types. COX-2 reacted positively in most cases and found no statistically significant difference between melanocytomas and melanomas. Among the melanomas, there was no statistical difference between the cell types for COX-2. The findings discussed here reveal interesting differences and similarities between the uveal melanocytic neoplasms in humans and dogs.

Keywords: Melanoma. Immunohistochemistry. Uvea. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Corte histológico do bulbo ocular apresentando melanocitoma uveal com extensão extraocular (H&E). Bar = 4 µm	50
Figura 2 -	Corte histológico do bulbo ocular, após a técnica de <i>bleaching</i> , apresentando melanocitoma uveal com extensão extraocular (H&E). Bar = 5µm	50
Figura 3 -	Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando células grandes poligonais repletas de melanina intracitoplasmática e células fusiformes com menor quantidade de melanina e baixo grau de atipia (H&E). Bar = 200 µm	51
Figura 4 -	Fotomicrografia de melanoma uveal de padrão celular misto, apresentando células epitelióides e fusiformes (H&E). Bar = 200 µm.....	51
Figura 5 -	Fotomicrografia de melanoma uveal apresentando forte positividade citoplasmática para o Melan-A (IHQ). Bar = 200 µm	52
Figura 6 -	Fotomicrografia de melanoma uveal fortemente positivo para HMB-45 (IHQ). Bar = 90 µm.....	52
Figura 7 -	Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando moderada positividade citoplasmática para Melan-A (IHQ). Bar = 100 µm.....	53
Figura 8 -	Fotomicrografia de melanoma uveal fortemente positivo para COX-2 (IHQ). Bar = 50 µm.....	53
Figura 9 -	Fotomicrografia de melanocitoma uveal fortemente positivo para COX-2 (IHQ). Bar = 50 µm.....	54
Figura 10 -	Fotomicrografia de melanoma uveal apresentando forte positividade nuclear do Ki- 67 em diversas células neoplásicas (IHQ). Bar = 50 µm	54
Figura 11 -	Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando ausência da expressão nuclear do Ki-67 (IHQ). Bar = 70 µm.....	55
Gráfico 1 -	Distribuição dos tumores melanocíticos quanto à raça	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição em relação ao sexo e idade.....	43
Tabela 2 - Características histopatológicas de todos os casos	44
Tabela 3 - Descrição das características clínicas segundo diagnóstico e resultado dos testes de associação.....	45
Tabela 4 - Descrição dos marcadores segundo diagnóstico e resultado dos testes comparativos.....	47
Tabela 5 - Correlação dos marcadores de todos animais e por diagnóstico, comparando intensidade e extensão da reação	48
Tabela 6 - Comparação entre a taxa do Ki-67 e o tipo celular nos melanomas.....	49
Tabela 7 - Descrição da extensão e intensidade do COX2 segundo tipo de célula nos animais com diagnóstico de melanoma e resultado do teste comparativo	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H&E	Hematoxilina-eosina
mm	Milímetros
µm	Micrómetro
SRD	Sem raça definida
Ed.	Edição
Ex.	Exemplo
=	Igual
%	Porcentagem
Bar	Barra
IHQ	Imunoistoquímica
COX-2	Ciclooxigenase-2
HMB-45	<i>Human Melanoma Black 45</i>
VEGF	Vascular endothelial growth factor
AINE	Anti-inflamatório não esteroide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Neoplasias melanocíticas	17
2.2	Melanocitoma uveal do cão.....	19
2.3	Melanoma uveal do cão.....	20
2.4	Melanoma uveal no ser humano	21
2.5	Diagnostico diferencial.....	22
2.6	Comportamento biológico no cão e no ser humano	23
2.7	Imunoistoquímica nas neoplasias melanocíticas do cão.....	28
2.8	Apresentações histológicas do melanocitoma e melanoma	30
2.9	Ki-67.....	32
2.10	Ciclooxigenase-2 (COX-2)	34
3	OBJETIVO	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1	Avaliação histopatológica.....	38
4.2	Avaliação imunoistoquímica.....	39
4.3	Avaliação do Melan-A, HMB-45 e COX-2	40
4.4	Avaliação do Ki-67	40
4.5	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Raça, sexo e idade	42
5.2	Achados histopatológicos	43
5.3	Achados imunoistoquímicos	45

6	DISCUSSÃO	42
7	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

O melanoma uveal tem sido alvo de pesquisa por ser potencialmente causador da perda de visão e, também, da diminuição da expectativa de vida do paciente. Apesar dos avanços significativos em seu diagnóstico, infelizmente ainda não houve progresso significativo no que se refere à taxa de sobrevivência em seres humanos (BLANCO et al., 2005). A etiologia do melanoma uveal permanece obscura (CUNHA et al., 2010). Alguns fatores, apesar de controversos, podem se relacionar com a etiologia desse tumor como: fatores ambientais (exposição aos raios ultravioleta), hormonais, genéticos e lesões predisponentes como melanoses congênitas e nevos (ABUJAMRA et al., 2000).

Nos últimos anos, a frequência dos tumores melanocíticos vem crescendo em seres humanos. Considerando que animais de companhia estão expostos aos mesmos fatores ambientais, o interesse por essas neoplasias vem aumentando (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 2001).

Modelos animais vêm sendo usados para avaliar novas modalidades diagnósticas, terapêuticas e da detecção precoce de metástase (BLANCO et al., 2005). A grande maioria dos modelos animais usa linhagens de células do melanoma uveal humano inoculados nos olhos de coelhos, camundongos ou animais de laboratório geneticamente modificados (BLANCO et al., 2005; OZERDEM, 2006; FOLBERG et al., 2007; DI CESARE et al., 2009). Simpson et al. (2014) ao compararem dados clínicos e histopatológicos do melanoma oral espontâneo em cães e seres humanos, concluíram que o cão pode ser útil como modelo biológico pelas suas similaridades nesse tipo de neoplasia.

O atual desenvolvimento da imunoistoquímica na medicina veterinária possibilita diagnósticos mais acurados assim como a avaliação do prognóstico e o reconhecimento das moléculas envolvidas no desenvolvimento e evolução das neoplasias (LACROUX et al., 2012). Os melanomas possuem diferentes comportamentos entre as espécies e localizações no corpo, sendo importante caracterizar o mecanismo molecular que influencia essa diversidade comportamental (RAWLINGS et al., 2003; DUBIELZIG et al., 2010).

Diferentemente do melanoma cutâneo em cães, pouco se sabe sobre a patogênese molecular do melanoma uveal. Apesar de o melanoma ser destrutivo para o olho, a taxa de metástase é pouco frequente, ainda mais quando comparada ao melanoma felino, que apresenta crescimento mais rápido e invasivo. O possível benefício desse estudo é a possibilidade de entender alguns fatores, que no futuro, possam ser usados para o

desenvolvimento de tratamentos para esses tumores nos cães. Além disso, a oportunidade de comparar os resultados dos marcadores imunoistoquímicos entre melanomas (maligno) e melanocitomas (benigno) vai permitir entender melhor a oncogênese desses tumores. Os mecanismos envolvidos na gênese e progressão do melanoma uveal não são claros; entretanto, novas abordagens moleculares são necessárias para melhor entender os mecanismos e achar fatores prognósticos e novos alvos terapêuticos.

Assim sendo, objetivou-se neste estudo avaliar as características moleculares das neoplasias melanocíticas uveais em cães, e assim, compreender melhor as diferenças entre o melanoma humano e o do cão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias melanocíticas

As neoplasias melanocíticas oculares, benignas ou malignas, podem manifestar-se nos animais domésticos e podem acometer as pálpebras, conjuntiva, órbita, limbo e úvea (MOULD et al., 2002; DUBIELZIG et al., 2010).

O melanoma é uma neoplasia maligna, comum no cão, originária de melanócitos ou melanoblastos (GOLDSCHMIDT, 1994). Pode ocorrer em todos os animais domésticos, de laboratório e em seres humanos (CAMARGO; CONCEIÇÃO; COSTA, 2008). Os melanócitos são células dendríticas produtoras de melanina, pigmento responsável pelas diferentes cores da pele, pelo e íris (PERRONE, 2001). O melanócito normal é derivado de melanoblastos da neuroectoderme que durante a embriogênese migram para a epiderme, derme e outras localizações, como a úvea (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; HU; SIMON; SARNA, 2008). Os melanossomos acumulados dentro do citoplasma dos ceratinócitos servem para proteger a pele contra os efeitos prejudiciais da radiação ultravioleta (CAMARGO; CONCEIÇÃO; COSTA, 2008). A síntese de melanina ocorre no interior dos melanossomos-organelas especializadas que possuem tirosinase ativa, enzima observada exclusivamente em melanócitos, a qual promove conversão da tirosinase em melanina (BARNHILL, 1995).

Melanócitos oculares estão presentes na pálpebra, conjuntiva, íris, corpo ciliar e coroide (HU, 2005).

Atualmente, pouco é conhecido sobre o início do melanoma nos animais. Em seres humanos e caprinos, o melanoma foi associado à mutação secundária à radiação solar UVA e UVB (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Hu (2005) afirma que os melanomas de coroide e corpo ciliar não são originados pela exposição solar, uma vez que essas estruturas recebem pouca radiação solar, ao passo que melanomas de conjuntiva e íris podem ser consequência dessa exposição. Segundo Simpson et al. (2014), o desenvolvimento de melanomas no cão em regiões com baixa incidência da radiação solar, como a cavidade oral, é sugestivo da ausência de influência da radiação UV.

Em seres humanos, o melanoma é mais comum em pessoas com íris e pele clara, o que não é observado em cães. Tal observação pode estar mais relacionada a fatores genéticos que ambientais (HU, 2005). Di Cesare et al. (2009) demonstraram que a luz azul pode aumentar significativamente a proliferação celular dos melanomas uveais.

A nomenclatura dos tumores melanocíticos intraoculares é inconsistente na literatura, dadas as variações do comportamento clínico e localização dos melanomas entre as espécies (HENDRIX, 2007). O termo “melanoma” costumava ser utilizado para descrever qualquer neoplasia melanocítica uveal no cão (RYAN; DITERS, 1984; BUSSANICH et al., 1987).

Friedman, Miller e Dubielzig (1989) sugeriram um sistema simplificado em que o melanoma uveal anterior é dividido em benigno ou maligno com base nas evidências histológicas de anaplasia celular. Segundo esses mesmos autores, o termo “maligno” corresponde a uma neoplasia com possibilidade de metástase. Recentemente o termo melanoma tem sido usado para caracterizar a neoplasia melanocítica com característica histológica maligna e melanocitoma a neoplasia com característica histológica benigna (GIULIANO et al., 1999; HENDRIX, 2007). Entretanto, Bussanich et al. (1987) e Friedman, Miller e Dubielzig (1989) consideraram o termo melanocitoma confuso, pois deriva do uso na oftalmologia humana, em que é empregado para designar um tumor plano que ocorre próximo ao disco óptico. A ocorrência do melanocitoma localizado na uvea anterior é rara. Segundo Ayres et al. (2003), o melanocitoma em seres humanos é um tumor intraocular benigno, densamente pigmentado e que comumente localiza-se ao nível do disco óptico ou adjacente a este, porém pode originar-se em qualquer região onde melanócitos ocorrem.

O melanoma é relativamente comum no cão, somando 3 % de todas as neoplasias e 7 % de todas as neoplasias malignas (SOUZA et al., 2006). Os locais frequentemente acometidos são a cavidade oral (56%), lábios (23%), pele (11%) e dígitos (8%) (GOLDSCHMIDT, 1994). Tecidos oculares representam apenas 2% (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Existe uma notável diferença entre o comportamento biológico do melanoma em diferentes localizações do organismo do cão. A maioria dos tumores orais tem comportamento maligno, enquanto melanomas cutâneos têm comportamento benigno, com exceção daqueles acometendo os dígitos (BOLON; CALDERWOOD; HALL, 1990; ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 2001). Entretanto, menos de 20% das neoplasias melanocíticas cutâneas no cão são malignas, fato esse que pode levar à falsa ideia de que os melanomas cutâneos são pouco agressivos (SIMPSON et al., 2014).

A maioria dos cães que apresentam melanoma tem mais de dez anos de idade, podendo ocorrer, contudo, a partir de um ano de idade. Uma frequência maior tem sido relatada em cães machos, similar a humanos em que a proporção de melanomas orais macho/fêmea é 2-3:1 (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

2.2 Melanocitoma uveal do cão

O termo “melanocitoma” designa as neoplasias benignas originárias de melanócitos. Também já foi denominado nevus melanocítico, nevus nevocelular, nevus pigmentado, nevus azul e melanoma benigno (PERRONE, 2001).

No ser humano, o melanocitoma é mais comumente associado ao nervo óptico, mas ocasionalmente pode ser encontrado no trato uveal (FINEMAN et al., 1998). Não há relatos de melanocitoma associado ao disco óptico no cão, contudo, é um achado comum na úvea anterior, raramente acomete a coroide (DUBIELZIG et al., 2010).

Dentre os tumores melanocíticos intraoculares, o melanocitoma soma aproximadamente 80%, enquanto o melanoma apenas 20% (DUBIELZIG et al., 2010). A diferenciação clínica entre os tumores melanocíticos não é confiável, uma vez que o melanocitoma pode ser localmente agressivo, invadindo o ângulo de drenagem e tecidos adjacentes (MOULD et al., 2002; PERLMANN, 2010), sendo o exame histopatológico indispensável no diagnóstico definitivo (ESSON et al., 2007). Apesar de os melanocitomas serem benignos, quando localizados na íris podem necrosar espontaneamente e causar dispersão de pigmentos que podem obstruir o ângulo de drenagem e desencadear glaucoma secundário (FINEMAN et al., 1998).

O melanocitoma frequentemente ocorre em olhos pigmentados ou apresentando melanose (DUBIELZIG et al., 2010). Independentemente da extensão, a remoção do olho geralmente é curativa. Dubielzig et al. (2010), entretanto, relataram recorrência orbitária em três casos na forma de melanoma.

2.3 Melanoma uveal do cão

Comparativamente, o cão é mais frequentemente diagnosticado com melanoma intraocular do que outros animais domésticos, sendo esta a neoplasia intraocular mais prevalente nessa espécie (BUSSANICH et al., 1987). Geralmente são unilaterais com poucos relatos da ocorrência da forma bilateral (BARROS et al., 1989; BRUNELLI et al., 2004). Apesar do estudo de o Giuliano et al. (1999) ter revelado maior prevalência em raças como Labrador Retriever, Golden Retriever e Schnauzer, concluiu-se que esse achado é apenas um reflexo da popularidade dessas raças, não havendo predisposição racial nos melanomas uveais em cães. É tipicamente uma neoplasia esporádica que ocorre em animais mais velhos e aparentemente não há predisposição sexual (MOULD et al., 2002).

A úvea anterior é o local mais comum para sua ocorrência, podendo raramente acometer coroide (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Os achados clínicos estão relacionados com o crescimento e a expansão do próprio tumor e suas alterações secundárias. Um simples exame oftalmológico pode revelar uma massa pigmentada intraocular; porém, alterações secundárias podem dificultar o diagnóstico (MOULD et al., 2002). Quando localizada na íris, os sinais clínicos incluem espessamento desta e irregularidade pupilar. Alterações secundárias à uveíte também podem ser desencadeadas, como hifema, edema de córnea, congestão episcleral, buftalmia, catarata, descolamento de retina e, por fim, perda da visão (BUSSANICH et al., 1987). Glaucoma secundário é alteração comum no melanoma uveal (MOULD et al., 2002), decorrente da obstrução do ângulo de drenagem por células neoplásicas ou por melanófagos flutuantes no humor aquoso (HENDRIX, 2007). A massa intraocular pode crescer e ocupar todo o espaço intraocular ou expandir-se para o espaço extraocular (BUSSANICH et al., 1987).

Melanomas de coroide são aqueles localizados inteiramente na coroide e, macroscopicamente, apresentam-se como uma massa densamente pigmentada de localização sub-retiniana claramente delimitada. Descolamento de retina e hemorragia sub-retiniana podem estar presentes. Com seu crescimento, muitos tumores de coroide rompem a membrana de Bruch, assumindo um aspecto característico: formato em cogumelo (MOULD et al., 2002).

Quando o tumor está confinado ao próprio olho, o tratamento indicado é a enucleação. A exenteração está indicada quando há extensão extraocular do tumor (RYAN; DITERS 1984). Outras opções de tratamento incluem a iridectomia ou fotocoagulação com laser diodo

em pequenos tumores pigmentados da íris (WILLIS; WILKIE, 2001). Não há indícios de que a quimioterapia seja eficaz no tratamento do melanoma (CAZALOT; RAYMOND-LETRON; REGNIER, 2008).

O diagnóstico precoce e o tratamento cirúrgico rápidos aumentam as chances de um prognóstico favorável (RYAN; DITERS, 1984). Em estudo de Wilcock e Peiffer (1986), com 48 neoplasias melanocíticas da úvea de cães, apenas três metástases foram observadas. Esse dado ressalta a baixa taxa de metástase do melanoma uveal em cães. Giuliano et al. (1999), entretanto, mostraram que animais acometidos pelo melanoma uveal têm menor expectativa de vida quando comparados a pacientes diagnosticados com melanocitoma uveal. A baixa taxa de metástase do melanoma uveal canino relatada na literatura veterinária pode estar relacionada a diversos fatores, como a maior quantidade de melanocitomas em comparação com melanomas e, ainda, aos diferentes critérios usados para diferenciar ambos os tumores (DUBIELZIG et al., 2010; SMEDLEY et al., 2011b).

2.4 Melanoma uveal no ser humano

O melanoma da úvea representa a neoplasia maligna primária intraocular mais comum no adulto. É também o tumor maligno primário mais prevalente da íris, embora corresponda a cerca de 5% dos melanomas uveais (FERREIRA et al., 2009). Nos seres humanos, a coroide é a localização mais comum dos melanomas intraoculares, os quais demonstram variantes morfológicas que permitem prever seu comportamento biológico (MOULD et al., 2002).

Um dos fatores de risco já estabelecido é ser caucasiano; ainda há discussão quanto à existência de predisposição genética. Diferentemente dos melanomas cutâneos, a exposição solar como fator de risco ainda é controversa. Está bem documentada a capacidade de causar metástases hematogênicas (principalmente para o fígado). Os tratamentos adotados para o melanoma uveal envolvem enucleação, ressecção local e aplicação de placa radioativa episcleral. A sobrevida em cinco anos após enucleação varia de 16% a 53%, dependendo do tamanho do tumor e 90% das mortes relacionadas ao tumor ocorrem nos primeiros 15 anos (SINGH; BERGMAN; SEREGARD, 2005). Miden et al. (1999) relataram metástase cerebral após 27 anos da enucleação de um olho que apresentava melanoma de coroide. Uma nova forma de obter informação prognóstica em tumores sólidos é a pesquisa de células malignas circulantes no sangue periférico (FERNANDES et al., 2007).

O melanoma da úvea é um tumor com importante agressividade, em que o diagnóstico precoce pode modificar o prognóstico de vida do portador (CUNHA et al., 2010).

Na escolha da terapêutica mais adequada deve-se considerar a clínica do paciente com o intuito de controlar o tumor sem colocar em risco sua saúde. Algumas opções terapêuticas estão indicadas para diferentes situações: observação periódica, fotocoagulação, radioterapia, braquiterapia, ressecção cirúrgica localizada, enucleação e exenteração. Todos atuando localmente, raramente interferindo na sobrevida. O principal fator determinante na escolha do tratamento é o tamanho da lesão tumoral. Geralmente, tumores de 2 a 3 mm de espessura e sem sinais de atividade podem ser seguidos com observação periódica; tumores médios com espessura de 3 a 5 mm podem ser tratados com braquiterapia, ressecção localizada ou até enucleação. Tumores grandes com espessura entre 5-10 mm podem ser tratados com braquiterapia ou enucleação e, para aqueles ainda maiores, com espessura entre 10 a 15 mm já se indica enucleação (ABUJAMRA et al., 2000). A iridectomia é recomendada para tumores localizados na íris, porém, há risco de recidiva (FERREIRA et al., 2009).

Apenas 5 a 8 % dos melanomas uveais no homem estão localizados na úvea anterior; esses tumores têm menor chance de disseminação que o melanoma de coróide, mesmo apresentando morfologia semelhante. Tal fato pode estar relacionado com a detecção precoce, ou pode, também, ser uma característica da neoplasia nessa localização (ZIMMERMAN, 1967).

2.5 Diagnóstico diferencial

Diversas neoplasias intraoculares já foram descritas nos cães (WILLIS; WILKIE, 2001). O adenocarcinoma de corpo ciliar é a segunda neoplasia intraocular mais comum no cão e apresenta comportamento benigno (TRUCKSA; MCLEAN; QUINN, 1985). Tais neoplasias podem ser pigmentadas ou não, sólidas ou papilíferas, invasivas ou não. O adenocarcinoma pigmentado do epitélio pigmentar do corpo ciliar pode mimetizar neoplasias melanocíticas e o uso de técnicas histológicas específicas para seu diagnóstico, como o *bleaching*, pode ser necessário (PERLMANN et al., 2010).

As neoplasias intraoculares secundárias mais comuns são linfoma, carcinoma pulmonar e hemangiossarcoma. O melanoma pode metastatizar para o olho e, comumente, a

mucosa oral é o sítio primário, pois seu comportamento biológico é mais agressivo quando comparado com melanomas de outras localizações (TRUCKSA; MCLEAN; QUINN, 1985).

Cisto de íris pode apresentar-se como uma massa pigmentada, mimetizando uma neoplasia melanocítica; não há necessidade, entretanto, de tratamento cirúrgico na maioria das vezes (HENDRIX, 2007). Seu diagnóstico pode ser realizado por meio de transiluminação e ultrassonografia ocular (MILLER, 2008).

O estafiloma, uma ectasia escleral, pode também mimetizar tumores pigmentados de corpo ciliar aparentando invadir a esclera (HENDRIX, 2007).

Outra alteração da íris que pode ser confundida clinicamente com as neoplasias melanocíticas é a melanose ocular. Pode haver espessamento da base da íris, glaucoma secundário pela obstrução do ângulo de drenagem por células pigmentadas e também escurecimento local da esclera. Geralmente apresenta-se unilateralmente, podendo ser bilateral no Cairn Terrier (DUBIELZIG et al., 2010). Muitos patologistas consideram que a melanose ocular é uma variação do melanocitoma difuso na íris. No entanto, Dubielzig et al. (2010) apenas consideram melanocitoma quando há nódulo uveal ou quando a massa é povoada pela mistura de células redondas e fusiformes densamente pigmentadas.

O tratamento da melanose ocular é a enucleação, pelo glaucoma secundário e suspeita de neoplasia (DUBIELZIG et al., 2010).

2.6 Comportamento biológico no cão e no ser humano

A correlação entre os aspectos histológicos e o prognóstico dos tumores melanocíticos em cães oferece pouca perspectiva sobre o comportamento biológico e pouco consenso na literatura (SPANGLER; KASS, 2006). Não há critérios prognósticos universalmente aceitos sobre as neoplasias melanocíticas em cães. Infelizmente, muitos artigos referentes ao prognóstico desses tumores vêm sendo citados sem que apresentem dados suficientes que comprovem suas alegações. As dificuldades em comparar os estudos já existentes são as diferenças dos sistemas de classificação, diferentes comportamentos em localizações distintas do corpo e, também, diferentes metodologias para avaliar parâmetros como índice mitótico ou fração de crescimento. Sem o prognóstico acurado, as recomendações apropriadas e terapias adjuntas não podem ser instituídas (SMEDLEY et al., 2011b).

Muito foi publicado na década de 1980 na tentativa de correlacionar morfologia, macro e microscópica, e o comportamento biológico dos tumores melanocíticos nos cães para estabelecimento de valores prognósticos (DITERS et al., 1983; RYAN; DITERS, 1984; TRUCKSA; MCLEAN; QUINN, 1985; WILCOCK; PEIFFER, 1986).

Tanto a localização, como as características histológicas de malignidade são fatores importantes na classificação das neoplasias melanocíticas. Neoplasias uveais densamente pigmentadas tendem a ter comportamento biológico benigno, diferentemente das neoplasias pouco pigmentadas, que podem demonstrar comportamento biológico mais agressivo (WILCOCK; PEIFFER, 1986; ESSON et al., 2007).

Metástases ocorrem por via hematogênica e podem apresentar maior frequência quando há extensão extraocular do tumor (TRUCKSA; MCLEAN; QUINN, 1985). Ainda assim, neoplasias confinadas à íris ou ao corpo ciliar, sem invasão escleral, também podem disseminar ou estender-se até o sistema nervoso central através do nervo óptico (RYAN; DITERS, 1984; FRIEDMAN; MILLER; DUBIELZIG, 1989).

Metástases podem acometer pulmão, fígado, rins, linfonodos, baço, coração e cérebro (DITERS et al., 1983, RYAN; DITERS, 1984, GALAN et al., 2009). Recidiva orbitária também pode ocorrer (DUBIELZIG et al., 2010).

O melanoma uveal pode ser primário ou secundário, não sendo possível diferenciar ambos pelo exame histopatológico (ESSON et al., 2007). A neoplasia primária é a mais frequente na úvea, entretanto, todo cão apresentando tumor pigmentado deve ser examinado para descartar possíveis focos primários, principalmente na cavidade oral, sendo este o foco primário mais comum de metástase intraocular (KONRADE et al., 2009).

A taxa de mitose já foi considerada como parâmetro mais acurado na predileção do potencial metastático; índice maior que quatro figuras de mitose por dez campos de alta magnificação é um alto indicativo de potencial metastático (WILCOCK; PEIFFER, 1986). Independentemente da localização, os fatores histológicos como taxa de mitose, atipia nuclear e invasibilidade do tumor podem ser considerados fatores prognósticos. Todavia, a predileção morfológica de malignidade tem sido inconsistente na literatura (ESSON et al., 2007). Sugeriu-se que a simples presença de mitose já seria indicativa de malignidade (DUBIELZIG, 1990). Wilcock e Peiffer (1986) afirmaram que o tipo celular do melanoma também não é preditivo do comportamento biológico, como ocorre no ser humano. Giuliano et al. (1999) observaram que cães acometidos pelo melanoma uveal obtiveram menor expectativa de vida quando comparados com aqueles que apresentaram melanocitoma uveal, contrastando com o dogma de que o melanoma só é relevante para aquelas alterações restritas ao próprio olho.

Segundo Hyman, Koch e Wilcock (2002), o tamanho e a extensão do tumor, assim como a taxa de mitose, não foram preditivos do comportamento biológico, o que difere das afirmações anteriores. Metástase geralmente ocorre entre três meses a um ano após a enucleação.

O melanoma pode ter diferentes comportamentos biológicos dependendo de sua localização no olho (WILCOCK; PEIFFER, 1986). A neoplasia oral é mais agressiva que a ocular, assim como a neoplasia uveal é mais agressiva que a neoplasia epibulbar (WILCOCK; PEIFFER, 1986).

Segundo Wilcock e Peiffer (1986), a ideia de que tumores devem ser considerados malignos por sua ação destrutiva no olho não é válida. Seu crescimento é primariamente por expansão bruta e sua proximidade com o ângulo de drenagem é responsável pelo glaucoma secundário, com consequente perda visual.

Em estudo com 91 melanomas uveais caninos, não houve disseminação tumoral de nenhum melanocitoma depois da enucleação (0/52), diferente dos melanomas (4/9). O número de melanocitomas foi superior ao de melanomas (WILCOCK; PEIFFER, 1986), similar ao resultado do estudo de Giuliano et al. (1999). Mesmo comparado aos melanocitomas, morte por melanoma uveal em cães é incomum e pode chegar a aproximadamente 8 % (GIULIANO et al., 1999; MOULD et al., 2002).

Para Dubielzig et al. (1985) e Friedman, Miller e Dubielzig (1989), os tumores melanocíticos da coroide nos cães possuem comportamento benignos; porém, existem relatos de metástase (HYMAN; KOCH; WILCOCK, 2002). É provável que o melanoma de coroide seja subdiagnosticado pela falta de exames fundoscópicos de rotina (DUBIELZIG et al., 1985). O diagnóstico histológico das neoplasias melanocíticas pode trazer algumas dificuldades, principalmente no que se refere à diferenciação entre melanoma e melanocitoma. Nesses casos, a técnica histológica de *bleaching* é muitas vezes essencial para avaliar o núcleo e o citoplasma dos tumores excessivamente pigmentados. Esse procedimento consiste em remover a melanina do corte histológico para melhor avaliar o núcleo das células (PERRONE, 2001).

Histologicamente, o melanocitoma é composto de células uniformes, grandes, redondas a poligonais, com núcleo pequeno e grande quantidade de melanina no citoplasma (FINEMAN et al., 1998). Quanto menos diferenciado, mais células fusiformes e menos células redondas densamente pigmentadas começam a predominar. O valor mitótico é uma característica valiosa para diferenciar melanoma do melanocitoma. Quatro figuras de mitose,

ou mais, por dez campos de alta magnificação são indicação de melanoma; contudo, não prevê a probabilidade de metástase (DUBIELZIG et al., 2010).

O melanoma pode ser menos pigmentado que o melanocitoma, podendo ser amelanótico (DUBIELZIG et al., 2010). Características anaplásicas do núcleo incluindo anisocariose, cariomegalia, nucléolo proeminente são normalmente encontradas (DUBIELZIG et al., 2010). Alguns melanomas apresentam áreas contendo células similares às aquelas encontradas no melanocitoma, sugerindo transformação maligna (DUBIELZIG et al., 2010; PERLMANN et al., 2010).

Segundo a classificação de Callender (1931) para o melanoma uveal em seres humanos, há dois padrões citológicos principais: fusiforme e epitelióide. Esse autor identificou dois subtipos de células fusiformes baseado na característica nuclear. O subtipo A tem núcleo delgado com cromatina fina e nucléolo indistinto. O subtipo B tem um núcleo maior, cromatina grosseira e nucléolo mais proeminente. Atividade mitótica é rara no subtipo A e infrequente no subtipo B. O padrão epitelióide é composto por células grandes e mais pleomórficas que as fusiformes. As células epitelióides geralmente apresentam citoplasma abundante com bordas distintas, dando à célula um formato poliédrico. Frequentemente, apresenta espaço extracelular entre as células adjacentes. Essa perda de coesão é um dos principais fatores de diferenciação entre o padrão fusiforme e epitelióide. A atividade mitótica é maior no padrão epitelióide (McLEAN et al., 1993).

Ainda segundo Callender (1931), o melanoma uveal pode ser dividido nos padrões: fusiforme A, fusiforme B, epitelióide e misto. McLean, Zimmerman e Evans (1978) recomendaram que a classificação de Callender (1931) sobre os padrões fusiformes A e B fossem consideradas apenas como melanomas fusiformes. Essa designação elimina o problema de classificar os melanomas mistos de fusiformes A e B.

O melanoma uveal canino consiste de variáveis combinações de células pigmentadas fusiformes ou redondas. As células fusiformes podem ter núcleo pequeno, redondo ou alongado e bordas celulares indistintas (MOULD et al., 2002).

As células ovóides são redondas ou ovais e maiores e mais pleomórficas que as células fusiformes, com maior proporção núcleo/citoplasma. Os núcleos são maiores com cromatina escassa e marginalizada e nucléolo proeminente. As células neoplásicas podem ser fortemente ou fracamente unidas e as bordas celulares variavelmente distintas. Mitoses são mais frequentes nesse grupo, mas tal característica pode variar em casos individuais (MOULD et al., 2002).

Células grandes, densamente pigmentadas, arredondadas ou poliédricas geralmente estão presentes (MOULD et al., 2002). Essas células foram consideradas como epitelioides no passado, mas lhes faltam as características de anaplasia nuclear e citoplasmática que caracteriza as células epitelioides dos melanomas oculares (DITERS et al., 1983). Essas células também já foram consideradas macrófagos, porém, uma análise das estruturas citoplasmáticas pela microscopia eletrônica revelou pré-melanossomos ou melanossomos maduros não fagocitados, provando tratar-se de células neoplásicas.

Friedman, Miller e Dubielzig (1989) e Mould et al. (2002) afirmaram que a classificação de Callender (1931) para os melanomas uveais em seres humanos é inapropriada para cães. As células fusiformes A não existem nos cães. As células epitelioides de núcleo grande, citoplasma eosinofílico com bordas bem definidas, também não. As células fusiformes nos cães são compatíveis com as fusiformes B, porém menores e menos pleomórficas. As células grandes, redondas, repletas de melanina, que existem em diversos tumores de cães, não fazem parte da classificação de Callender, mas assemelham-se muito com o melanocitoma humano (MOULD et al., 2002). Assim, os valores prognósticos da classificação de Callender não podem ser extrapolados para os melanomas de cães (FRIEDMAN; MILLER; DUBIELZIG, 1989; MOULD et al., 2002), uma vez que o número de metástases é menor do que seria esperado se a classificação de Callender predissesse o comportamento biológico dos melanomas caninos (FRIEDMAN; MILLER; DUBIELZIG, 1989).

Nos seres humanos, as células fusiformes A e B têm menor taxa de metástase comparada com tumores compostos por células epitelioides ou padrões mistos (MCLEAN et al., 1993). O estudo histológico do tumor apresenta importância prognóstica. O diagnóstico histológico de células epitelióides sugere pior prognóstico no homem. Tumores grandes, com alta atividade mitótica, infiltração escleral e necrose tumoral, podem também piorar o prognóstico nessa espécie. Outros fatores prognósticos são: infiltração linfocitária, presença de células na margem do nervo óptico e disseminação orbitária (MCLEAN et al., 1993). Folberg et al. (1997) consideraram a possibilidade da presença de padrões vasculares dentro do tumor, como o *loop* vascular fechado, como maior chance de disseminação.

Vários fatores histológicos vêm sendo considerados como indicadores de prognóstico no cão. Entretanto, fatores como necrose, inflamação, grau de pigmentação, invasão de córnea, ângulo de drenagem e episclera não foram úteis como indicativo prognóstico (MOULD et al., 2002). Segundo Giuliano et al. (1999), a taxa de mitose não é indicativa prognóstica no cão e, em estudo de Wilcock e Peiffer (1986), o tipo celular também não.

Esses dados são comparáveis com os melanomas cutâneos (GROSS; IHRKE; WALDER, 1992).

Os melanomas amelanicos podem assumir padrões morfológicos extremamente variados, podendo mimetizar carcinomas, sarcomas, linfomas, plasmocitomas, entre outros (BANERJEE e HARRIS, 2000). Os melanomas hipopigmentados podem apresentar células balonosas (melanócitos com o citoplasma vacuolizado e núcleo redondo), apresentando-se como células individuais, em aglomerados ou, mais raramente, como uma população uniforme (DUBIELZIG et al., 2010). Wilkerson et al. (2003) relataram um caso de melanoma uveal de células balonosas com metástase em um cão. É importante diferenciar essas células do xantogranuloma na íris, uma lesão benigna que apresenta macrófagos com citoplasma vacuolizado (WILKERSON et al., 2003).

2.7 Diagnóstico imunoistoquímico

A distinção de melanomas pouco diferenciados de outros tipos de neoplasia é um dilema que os patologistas enfrentam; contudo a imunoistoquímica tem se tornado um exame útil nesses casos (SULAIMON; KITCHELL; EHRHART, 2002). Essa técnica permite identificar a histogênese das neoplasias morfológicamente indiferenciadas. Consiste no uso de anticorpos selecionados para identificar antígenos específicos no tecido (FARAGONE, 1999). A imunoistoquímica pode ajudar no diagnóstico e prognóstico de tumores com informações adicionais, especialmente em casos difíceis, com achados histopatológicos ambíguos (LACROUX et al., 2010).

O advento de anticorpos murinos específicos para antígenos associados ao melanoma, particularmente melanossomas, ajudou a melhorar o valor da IHQ no diagnóstico do melanoma na medicina humana. Muitas vezes, um painel de anticorpos apropriados é considerado uma abordagem útil na literatura veterinária (BERRINGTON et al., 1994).

A publicação de um artigo por Coons et al. (1941) descrevendo uma técnica de imunofluorescência para a detecção de antígenos celulares em cortes teciduais marcou o início da imunoistoquímica. Desde então, a imunoistoquímica tornou-se uma ferramenta valiosa para o diagnóstico e investigação de doenças infecciosas e neoplásicas em uma variedade de animais. A base da imunoistoquímica é muito simples e combina três disciplinas científicas: imunologia, histologia e química. O conceito básico por detrás da

imunoistoquímica é a demonstração de antígenos nos tecidos por meio de anticorpos específicos. Uma vez que a ligação antígeno-anticorpo (ocorre, demonstra-se como uma reação de cor histoquímica visível por microscopia de luz ou fluorocromos com luz ultravioleta. Embora conceitualmente simples, a metodologia da imunoistoquímica tornou-se mais complexa com metas mais rigorosas de sensibilidade e especificidade. Inicialmente, métodos simples (direto) foram utilizados, o que produziu resultados rápidos, mas com pouca sensibilidade (RAMOS-VARA, 2005).

Atualmente, métodos extremamente sensíveis estão disponíveis para a detecção de um ou vários antígenos simultaneamente ou mesmo para examinar centenas de tecidos na mesma secção para a presença de um antígeno particular (*microarray technology*). Outro avanço crítico na década de 1990 foi de técnicas para recuperar antígenos que tinham sido modificados por fixação por meio de calor, o que aumentou exponencialmente o número de antígenos detectáveis em tecidos fixados rotineiramente. Patologistas veterinários enfrentam muitos desafios ao realizar a imunoistoquímica por causa da diversidade de espécies estudadas e por não haver garantias de que irá ocorrer reação cruzada dos antígenos entre espécies diferentes. A imunoistoquímica foi estabelecida como uma metodologia sólida e confiável para ambas as atividades de rotina de diagnóstico e pesquisa na medicina veterinária (RAMOS-VARA, 2005).

A sensibilidade e a especificidade quando falamos em procedimentos imunoistoquímicos têm aspectos próprios. A sensibilidade é a capacidade do teste em produzir o resultado desejado, e há dois componentes a serem avaliados: no anticorpo, a identificação da percentagem de resultados positivos verdadeiros e no método, o mínimo detectável de antígeno na lâmina. A especificidade (capacidade do teste em detectar positivos verdadeiros e não falsos negativos) é afetada por duas variáveis: fixação e processamento do tecido (estas muitas vezes fogem ao controle do patologista responsável pelo exame imunoistoquímico) e a metodologia usada (clone dos anticorpos e sistema de detecção). A fixação dos tecidos nos laboratórios de patologia não é uniformizada; dessa forma, os tecidos estão ou fixados em excesso ou pouco fixados. A fixação em excesso não traz problemas mais sérios para a realização da técnica de imunoistoquímica, já a fixação reduzida é extremamente deletéria para esse tipo de exame, pois teremos autólise tecidual, com perda da antigenicidade (falsos negativos). Os motivos para as divergências relatadas na literatura na sensibilidade e especificidade dos anticorpos estão relacionados a uma gama variada de fatores: 1) emprego de anticorpos diversos (geralmente clones diferentes); 2) a não uniformidade dos sistemas de detecção (sistemas de amplificação de alto desempenho, tais como: avidina- biotina-

peroxidase; estreptavidina- biotina-peroxidase; avidina marcada; sistemas baseados na detecção de polímeros); 3) métodos diversos de recuperação antigênica e de pré-tratamento do tecido (ex.: digestão enzimática); 4) diferentes definições de tumor; 5) diferentes definições de positividade (percentagem de células positivas; intensidade de positividade ou uma combinação de percentagem de positividade com intensidade da positividade (ex.: escore Allred). Existem muitas fontes comerciais de anticorpos confiáveis, infelizmente a maioria delas situadas no exterior, e apenas muito poucas com representantes comerciais no Brasil (BARRA, 2006)

Os limiares de positividade para imunoistoquímica podem ser definidos como: negativo; positividade focal (1-25%); positividade variável (25-75%) e uniformemente positiva (mais de 75%). Uma reação positiva verdadeira mostra deposição do cromógeno em células ou estruturas que contêm o antígeno de interesse. Já em uma reação falso-positiva há deposição do cromógeno em estruturas que não deveriam conter o antígeno (células tumorais positivas e o estroma intercelular também). Alguns dos motivos para essa falsa positividade são: peroxidase endógena; biotina endógena (presente em concentrações altas no fígado e rins); concentração inadequada (alta) do anticorpo e identificação equivocada de pigmentos (melanina; hemossiderina) como positividade do anticorpo (3). Os anticorpos têm sua expressão em locais específicos da célula, tais como: citoplasma (citoqueratinas); núcleo e citoplasma (proteína S100); núcleo (receptor de estrógeno); membrana citoplasmática (CD20); membrana e Golgi (CD30); membrana com localização apical (vilina) e marcação extracelular (colágeno tipo IV) (BARRA, 2006).

2.8 Imunoistoquímica nas neoplasias melanocíticas do cão

O diagnóstico do melanoma pode ser desafiador, especialmente de tumores que não apresentam melanina (SMITH; GOLDSMIDT; MCMANUS, 2002). Melanomas amelanóticos ou pouco diferenciados muitas vezes iludem o diagnóstico definitivo e uma série de neoplasias pode mimetizar melanoma microscopicamente. Por essas razões, vários métodos de diagnóstico auxiliares têm sido desenvolvidos num esforço para chegar a um diagnóstico mais preciso. Antes do aparecimento da imunoistoquímica, a coloração de Fontana-Massom era muito usada para diagnosticar melanomas hipopigmentados ou amelanóticos (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Técnicas histoquímicas mais

tradicionais estão tomando o segundo lugar para imunoistoquímica, incorporando o uso de anticorpos monoclonais e policlonais (SMITH; GOLDSMIDT; MCMANUS, 2002).

Para facilitar o diagnóstico e torná-lo mais confiável, mais de um marcador imunoistoquímico deve ser utilizado nos melanomas amelanóticos (CHOI; KUSEWITT, 2003).

O Melan-A é um produto do gene MART-1, que é reconhecido como antígeno em neoplasias melanocíticas por linfócito T citotóxico autólogo, e é, geralmente, fortemente positivo no citoplasma dos melanócitos. É um marcador altamente específico para neoplasias melanocíticas, podendo ser o mais específico, até o presente momento, para o melanoma canino (SMEDLEY et al., 2011a).

O HMB-45 (*human melanoma black 45*) é outro marcador altamente específico para a diferenciação melanocítica em tumores malignos (FARAGONE, 1999). Berrington, Jimbow e Haines (1994) reportaram que o HMB-45 não tem reação cruzada com os melanomas caninos, entretanto, Sulaimon, Kitchell e Ehrhart (2002) provaram que esse marcador pode ser útil no diagnóstico de melanomas amelanóticos. Mais recentemente, Barros et al. (2010) mostraram a eficácia do HMB-45 nas neoplasias melanocíticas da úvea canina.

Ramos-Vara et al. (2000) fizeram uma análise imunoistoquímica com 122 cães apresentando melanoma oral e sete melanomas metastáticos de sítios primários desconhecidos. Os tumores foram 92% positivos para Melan-A, 100% positivos para vimentina e 98% positivos para proteína S-100. Foi concluído que o Melan-A é um marcador útil e específico para a derivação melanocítica nos tumores da linhagem incerta.

Um estudo um pouco mais recente com 29 tumores melanocíticos caninos, que incluía dez melanomas, 11 melanocitomas e oito tumores de origens desconhecidas, mostrou que Melan-A foi positivo em 90% dos tumores pigmentos, mas não reagiu com tumores amelanóticos (KOENING et al., 2006). No estudo, o Melan-A foi raramente positivo nos tumores malignos, sendo que apenas três dos dez melanomas foram positivamente corados para Melan-A (todos pigmentados). Por outro lado, todos os 11 melanocitomas foram positivos, com dez deles estes classificados como moderados a fortemente positivos (todos os tumores benignos eram pigmentados). Os autores sugeriram que a coloração por Melan-A pode estar correlacionada com comportamento biológico, com tumores benignos apresentando coloração moderadamente ou fortemente positiva e tumores malignos mostrando coloração fraca ou negativa (KOENING et al., 2001). Outro estudo relatou que o Melan-A obteve alto percentual de positividade em melanomas (83 %) comparado com

melanocitomas (32%); entretanto, os autores não descreveram os critérios usados para classificar esses tumores (SMEDLEY et al., 2011b).

Ainda não foi provado que a expressão do Melan-A pode predizer o comportamento biológico, mas pode ser um marcador útil para a identificação de tumores de linhagens incertas, especialmente quando usado em combinação com a proteína S-100 (SMITH, GOLDSMIDT, MCMANUS, 2002).

A especificidade e sensibilidade do Melan-A e HMB-45, em cães, é inconsistente na literatura veterinária. Segundo Choi e Kusewitt (2003), o Melan A apresenta maior sensibilidade para melanomas caninos que o HMB-45 (CHOI; KUSEWITT; 2003). Smedley et al. (2011a) relataram que o HMB-45 é 100% específico para o melanoma em cães, todavia, apresenta baixa sensibilidade.

No estudo de Lacroux et al. (2012), com 65 tumores melanocíticos cutâneos em cães, todos obtiveram reação citoplasmática para Melan-A. Diferentes de outros estudos, não houve correlação entre a expressão do Melan-A e seu comportamento biológico.

Embora o anticorpo monoclonal para HMB-45 tenha demonstrado ser um marcador sensível para certos subtipos de melanomas humanos, é geralmente considerado menos útil em animais. A utilidade do HMB-45 para os tumores em animais pode ser melhorada por meio de um processo que inclui o pré-tratamento de tecidos fixados por formalina com permanganato de potássio e ácido oxálico. Um estudo relata que 88% dos melanomas estudados marcaram positivamente para HMB-45 depois desse processo, enquanto apenas 6% dos tumores não melanocíticos foram positivos (SULAIMON; EHRHART; KITCHELL, 2002).

2.9 KI-67

O Ki-67, uma proteína nuclear não-histônica que é expressa em todas as fases do ciclo celular (G1-M), mas não em células em descanso (G0); é um marcador de proliferação frequentemente utilizado para a determinação da atividade proliferativa de um tumor. A mensuração da proliferação tumoral tem mostrado boa correlação com o comportamento biológico de tumores em seres humanos, cães e gatos, e pode fornecer valiosa informação sobre o prognóstico desses tumores. O valor significativo do tamanho do tumor como fator prognóstico no melanoma canino é controverso. Entretanto, é aceito que tumores

apresentando populações celulares com alta atividade mitótica terão pior prognóstico do que aqueles com baixa taxa de proliferação. Sua expressão é considerada uma medida da fração de crescimento tumoral. O índice Ki-67 vem sendo usado rotineiramente no prognóstico de tumores na oncologia humana e nos mastocitomas caninos (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999).

O índice Ki-67 é um método muito valioso para indicar o prognóstico de tumores mamários malignos em cães (KADTHUR et al., 2001) e melanomas cutâneos (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Bergin et al. (2011) relataram que o índice Ki-67, atipia nuclear, e índice mitótico são métodos comparáveis na avaliação do prognóstico do melanoma oral em cães.

Os achados histológicos das neoplásicas melanocíticas no cão apoiam a afirmação que o comportamento dos tumores melanocíticos apresenta espectro contínuo entre claramente benigno até altamente maligno. Assim, a transição dessas duas categorias pode ser de difícil diagnóstico. Apesar do diagnóstico baseado nas características morfológicas de malignidade trazer certo grau de incerteza, o diagnóstico correto pode ser útil para estabelecer o prognóstico e plano de tratamento (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Perlmann et al. (2011), usando a marcação do Ki-67 nos tumores melanocíticos intraoculares em cães, chegaram à conclusão de que esse marcador pode ser usado na diferenciação entre melanomas e melanocitomas. Os autores mostraram que a marcação do Ki-67 é consideravelmente maior nos melanomas.

Roels, Tilmant e Ducatelle (1999) correlacionaram positivamente a expressão do Ki-67 com fatores histológicos de prognósticos já bem estabelecidos, como a morfologia e crescimento invasivo do tumor.

Nos melanomas uveais em seres humanos, Liang et al. (2001) mostraram maior positividade do Ki-67 em tumores contendo células epitelioides e tumores de maior extensão. Porém não houve correlação entre a localização do tumor, idade e invasão escleral.

O valor da determinação de um índice de proliferação utilizando o Ki-67, a qual identifica as células em proliferação, foi investigada. Um estudo examinou 27 cães e gatos apresentando tumores melanocíticos da pele e mucosa, oito benignos e 19 malignos, correlacionando a atividade do Ki-67 com seis meses de sobrevida. A alta atividade do Ki-67 foi relacionada com baixa expectativa de vida, assim como a presença de crescimento invasivo e classificação baseada em critérios citológicos (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Em outro estudo, o Ki-67 foi aplicado a 68 neoplasias melanocíticas cutâneas caninas para determinar se o nível de imunorreatividade se correlacionaria com dois

anos de sobrevivência. 18 dos 68 tumores foram classificados como malignos histologicamente. O valor preditivo do índice Ki-67 para dois anos de sobrevivência foi de 97%, que foi apenas ligeiramente maior do que o valor preditivo associado com a avaliação histológica (91%) (LAPRIE et al., 2001). O alto índice de proliferação (mais de 15% de positividade para Ki-67) e os achados histopatológicos de malignidade foram correlacionados com pior prognóstico nos melanomas cutâneos em cães. Os achados com baixo índice (menos de 15% de positividade para Ki-67) obtiveram melhor prognóstico. O valor preditivo do índice de proliferação Ki-67 foi maior (97%) que a classificação histopatológica (91%). Nesse estudo, foi identificado um subgrupo de quatro casos (de 68 no total) classificados histopatologicamente como malignos e com índice de proliferação baixo (menor que 15%). Estes casos mostraram sobrevida maior (LAPRIE et al., 2001).

A análise da expressão do Ki-67 deve ser realizada por meio de imagem computadorizada por ser mais confiável que a classificação morfológica dos tumores melanocíticos (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999).

2.10 Ciclooxygenase-2 (COX-2)

O papel da ciclooxygenase-2 (COX-2) na progressão do câncer vem sendo uma área de grande estudo. A COX-2 é uma enzima que cataliza a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, os quais são fundamentais para manter a homeostase celular. As responsabilidades fisiológicas dessas substâncias incluem preservar o fluxo de sangue renal e da barreira mucosa gastrointestinal. Em seu estado patológico, elas promovem inflamação. Células inflamatórias, como macrófagos e sinoviócitos, expressam COX-2, e subsequentemente, aumentam o nível de prostaglandinas e tromboxanos como parte da cascata inflamatória. Condições celulares, como hipoxia, citocinas (interleucina 6), oncogenes (ras e scr), e fator de crescimento vascular (VEGF), aumentam a expressão da COX-2. A expressão da COX-2 pode ser detectada em células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos e células neoplásicas (PAGLIA et al., 2009).

A COX-2 é uma enzima expressa em resposta a estímulos inflamatórios e mutagênicos, estando relacionada a vários processos como proliferação tumoral, imunossupressão e metástases (WILLIAMS et al., 2001; KOJIMA et al., 2001). O aumento da COX-2 ajuda a promover a invasibilidade da célula tumoral que é mediado por meio do

aumento da atividade da matriz metaloproteinase 2 e 9. A COX-2 promove expressão da proteína antiapoptótica bcl-2, assim inibindo a senescência celular (HELLER et al., 2005).

Recentemente, à COX-2 foi atribuído ter papel fundamental na carcinogênese, angiogênese relacionada ao crescimento tumoral, e metástase em seres humanos. Em cães, a COX-2 já foi expressa em diversos tumores como o carcinoma mamário, com resultados similares àqueles encontrados nos seres humanos (PAGLIA et al., 2009). A expressão da COX-2 leva a progressão da neoplasia através da promoção de invasão, angiogênese, metástase e inibição da apoptose (HELLER et al., 2005).

Quanto maior o número de macrófagos no tumor, maior a expressão da COX-2. Foi sugerido que a expressão da COX-2 pelos macrófagos pode aumentar a invasibilidade do tumor e seu potencial metastático, assim correlacionando com pior prognóstico. A COX-2 vem sendo correlacionada com pior prognóstico nos melanomas uveais em seres humanos (MARSHALL et al., 2007).

A expressão da COX-2 vem sendo correlacionada com a progressão de melanomas em seres humanos e foi sugerido que pode ser um método de diferenciar melanomas de lesões melanocíticas benignas e formular um prognóstico (FIGUEIREDO et al., 2003; PIRES et al., 2010). O aumento da expressão da COX-2 está relacionado com o desenvolvimento e progressão de diversas neoplasias epiteliais (GOULET et al., 2003).

No estudo de Paglia et al. (2009) com tumores melanocíticos uveais em cães só os melanomas expressaram COX-2. Não houve reação entre os melanocitomas. No estudo de Pires et al. (2010), os melanocitomas cutâneo não expressaram COX-2, entretanto mais de 50% dos melanomas reagiram para esse marcador. Esses achados sugerem que a COX-2 pode estar envolvida com a transformação maligna das lesões melanocíticas.

Em um estudo com cães, o melanoma oral obteve maior reatividade da COX-2 que o melanoma cutâneo. Os melanomas no dígito do cão demonstraram maior expressão comparados com melanomas de outras partes do corpo, concluindo que a expressão da COX-2 revela maior potencial metastático (PIRES et al., 2010). Heller et al. (2005) revelaram que a frequência e a intensidade da reação da COX-2 nos carcinomas mamários foram maiores nos tumores apresentando menor diferenciação e anaplasia. Em um estudo com melanoma uveal em seres humanos, a expressão, score e intensidade foram correlacionados com morte por metástase em humanos (FIGUEIREDO et al., 2003).

O melanoma canino é uma neoplasia com potencial metastático e é resistente à maioria dos regimes terapêuticos. Para avaliar a eficácia de tratamentos como os AINEs,

conhecimento sobre a expressão da COX pelas células tumorais é necessário (PIRES et al., 2010).

COX-1 e COX-2 são os principais alvos dos AINEs e a inibição da COX-2 por essas drogas aparenta ter validade na prevenção ou tratamento em casos de tumores em seres humanos como o carcinoma de colón, câncer mamário e melanoma (GOULET et al., 2003; MARSHALL et al., 2007). Entretanto existem poucos estudos com a expressão do COX-2 nos melanomas caninos (PIRES et al., 2010). Esse dado fez com que pesquisadores começassem a usar AINEs em tumores que expressarem COX-2 como opção terapêutica (PAGLIA et al., 2009). Possíveis mecanismos pelos quais inibidores da COX-2 agem incluem o efeito local sobre o tumor primário na proliferação e angiogênese impedindo as células de deixarem o tumor pela diminuição da mobilidade e capacidade de invasão (MARSHALL et al., 2007).

O uso de nepafenac 0,3% tópico, um inibidor da COX-2, inibiu a progressão do melanoma uveal humano em modelo animal usando coelhos (MARSHALL et al., 2007). Inibidores de COX-2 podem ser usados no tratamento do melanoma canino, entretanto mais estudos são necessários para entender sua eficácia (PIRES et al., 2010).

3 OBJETIVO

Trazer conhecimento à biologia molecular do melanoma da úvea por meio de marcadores imunoistoquímicos dos vários compartimentos celulares. O escopo do trabalho compreende, ainda, a compreensão dos motivos que esclareçam o baixo índice de metástases encontrado nessa espécie animal comparativamente ao melanoma uveal dos humanos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 64 olhos de 64 cães com diagnóstico histopatológico de neoplasia intraocular primária de origem melanocítica, provenientes ou referidos ao Serviço de Oftalmologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os olhos enucleados foram fixados em solução de formalina a 10 %, seccionados pelo plano sagital por uma navalha afiada sobre superfície de madeira, de maneira a incluir todas as estruturas do bulbo ocular, e posteriormente submetidos a exame macroscópico. As peças foram processadas seguindo as técnicas rotineiras de inclusão em parafina, seccionadas em micrótomo em cortes de 5 μ de espessura e coradas (Figura 1) com hematoxilina-eosina (HE) (MICHALANY, 1998).

Os cortes histológicos foram incubados durante 24 horas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 30 volumes com o objetivo de remover a melanina intracitoplasmática (Figura 2). Essa técnica, chamada de *bleaching*, foi utilizada em todos os casos onde a avaliação nuclear não foi possível pelo excesso de melanina intracitoplasmática.

Todas as lâminas processadas foram digitalizadas e avaliadas no computador pelo software *Aperio ePathology Imagescope*.

4.1 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica foi realizada para distinguir melanomas de melanocitomas, avaliar padrão celular dos tumores, a origem, grau de pigmentação, extensão do tumor, presença de extensão extraocular, figuras de mitose (contadas em dez campos de alta magnificação), presença de infiltrado inflamatório e necrose.

Foram considerados melanocitomas (Figura 3) as neoplasias caracterizadas por células redondas ou poliédricas, densamente pigmentadas ou não, com núcleo pequeno e baixo grau de pleomorfismo, podendo, ainda, haver células fusiformes com baixo grau de atipia. Os tumores apresentando características histológicas de malignidade (Figura 4), como atipia

celular, nucléolo evidente, anisocariose, cariomegalia e quatro ou mais figuras de mitose em dez campos de alta magnificação, foram considerados melanomas (DUBIELZIG et al., 2010).

Quanto ao grau de pigmentação, tumores apresentando menos de 50% de pigmentação foram classificados como baixo, e tumores com mais de 50% de melanina foram classificados como alto. Quanto à necrose, a graduação variou de 0 a 2, sendo o grau 0 os tumores livres de necrose, 1 apresentando pouca necrose e 2 os tumores apresentando alto grau de necrose. A simples presença ou ausência de infiltrado linfocítico e do *loop* vascular foram anotadas. A quantidade do infiltrado intratumoral de histiócitos foi classificada subjetivamente como ausente, discreto e intenso.

4.2 Imunoistoquímica

As análises imunoistoquímicas foram realizadas no Henry C. Witelson Ocular Pathology Laboratory do Departamento de Oftalmologia e Patologia da Universidade McGill, Montreal, Canadá, sob a supervisão do Prof. Miguel N. Burnier Jr.

Foram realizadas de forma automatizada na máquina Ventana BenchMark da Ventana Medical System Inc., Arizona, seguindo protocolo e instruções preconizadas. O processamento total automatizado das lâminas identificadas com código de barras inclui seu aquecimento, desparafinação sem solvente e recuperação antigênica com CC1 (Tris-Borato-EDTA solução pH 8.0). As lâminas foram incubadas com os anticorpos selecionados para identificar os antígenos específicos no tecido.

Como controles positivos foram utilizadas amostras de tumores e como negativos o anticorpo primário foi omitido.

Os anticorpos anti-HMB-45, anti-Melan-A, anti-COX-2 e anti-Ki-67 foram utilizados. As lâminas foram incubadas com anticorpos monoclonais de coelho para HMB-45 (DakoCytomation, Mississauga, Ontario, Canada) na diluição 1:40 por 32 minutos, Melan-A (NCL-L-Melan-A, diluição 1:10 por 32 minutos, Novocastra Laboratories Ltda, United Kingdom). Cortes de melanoma cutâneo humano foram utilizados como controles positivos para ambos os marcadores. As lâminas foram incubadas com anticorpo monoclonal de camundongo para Ki-67 (ab833-Acam, Cambridge, MA, USA) na diluição 1:10 por 32 minutos, cortes de linfonodos humanos foram usados como controle positivo, e para COX-2

(Zymed Laboratories Inc. CA, USA) na diluição 1:100 por 36 minutos. Cortes de adenocarcinoma de colon foram usados como controle positivo. Como controles negativos, anticorpo primário foi omitido.

A coloração cromógena vermelha foi utilizada em todos os casos para facilitar a diferenciação da melanina da reação positiva. Assim não foi necessária a realização da técnica de *bleaching*, que pode causar perda antigênica (JIANG et al., 2014).

4.3 Avaliação do Melan-A, HMB-45 e COX-2

Para a análise do Melan-A, HMB-45 e COX-2, cada corte histológico foi avaliado de baixa a alta magnificação para classificar a extensão de células positivas em 0 (1-10% das células), 1 (11-50%), 2 (51-80%) e 3 (80-100%) e a intensidade da reação em ausente (0), fraca (1), moderada (2) ou forte (3).

4.4 Avaliação do Ki-67

Para a avaliação do Ki-67, foi realizada a varredura dos tumores em baixa magnificação até encontrar área de maior positividade nuclear. Áreas de necrose ou inflamação foram evitadas porque células inflamatórias podem ser positivas. Em alta magnificação a área de maior positividade foi digitalmente fotografada e com auxílio do *software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java)* os núcleos das células neoplásicas positivos e negativos foram contados e o índice de marcação do Ki-67 foi definido pela razão correspondente ao número de núcleos positivos e negativos no campo selecionado.

4.5 Análise estatística

As características clínicas qualitativas dos animais foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas e as características quantitativas foram descritas com uso de

medidas resumos (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

As características clínicas foram descritas segundo diagnóstico e comparadas entre os diagnósticos com uso de testes qui-quadrado, testes exatos de Fisher ou testes da razão de verossimilhanças (KIRKWOOD E STERNE, 2006). Os marcadores foram descritos segundo diagnóstico e comparados com uso de testes Mann-Whitney (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

Foram calculadas as correlações de Spearman (KIRKWOOD; STERNE, 2006) entre os marcadores, tanto no total dos animais como no segundo diagnóstico para verificar a existência de correlação entre os marcadores.

Para os animais diagnosticados como melanoma foram comparados os níveis de Ki67 entre os tipos de células encontrados com uso do teste Kruskal-Wallis (KIRKWOOD; STERNE, 2006).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Raça, sexo e idade

Não houve predisposição sexual nos casos estudados, sendo que 50% dos casos eram machos. No que se refere à raça, no entanto, cães sem raça definida (SRD) apresentaram-se em maior número, seguido do Labrador Retriever e Cocker Spaniel Inglês. Entretanto, ao total, 15 raças diferentes foram acometidas, mostrando que não existiu prevalência racial (Gráfico 1). A idade média foi dez anos, com variação de um a 15 anos (Tabela 1).

Gráfico 1 - Distribuição dos tumores melanocíticos quanto a raça

Tabela 1 - Distribuição em relação ao sexo e idade

Variável	Descrição
Sexo, n (%)	
Fêmea	32 (50,0)
Macho	32 (50,0)
Idade (anos)	
Média (DP)	10,0 (2,9)
Mediana (mín.; máx.)	10 (1; 15)

5.2 Achados histopatológicos

Com base nos critérios estabelecidos foram diagnosticados 37 melanocitomas e 27 melanomas. Foram observados três padrões celulares predominantes nos melanomas que incluem células fusiformes, epitelioides e tumores apresentando ambas as células (misto). Muitos melanomas apresentaram componentes de melanocitoma.

A localização mais comum das neoplasias melanocíticas foi a úvea anterior (íris e corpo ciliar) com apenas três tumores originários da coroide. Em dez casos, o tumor ocupava praticamente todo o espaço intraocular e não foi possível determinar sua origem. A tabela 2 mostra os achados histopatológicos gerais.

Os animais com diagnóstico de melanoma apresentaram tumores de maior extensão ($p<0,001$), menor grau de pigmentação ($p<0,001$), maior presença de extensão extraocular ($p=0,014$) e maior grau de necrose ($p=0,026$). Foi observado infiltrado linfocítico intratumoral em 62,5% dos casos com mais frequência nos melanomas que o melanocitoma, com 48,1 e 29,7% respectivamente. Em todos os casos histiócitos foram observados (Tabela 3).

Tabela 2 - Características histopatológicas de todos os casos

Variável	Descrição
Tamanho do tumor, n (%)	
1/3 do olho	41 (64,1)
2/3 do olho	13 (20,3)
Olho inteiro	10 (15,6)
Grau de pigmentação, n (%)	
Baixo	17 (26,6)
Alto	47 (73,4)
Tipo de célula, n (%)*	
Misto, predominância de fusiformes	3 (11,1)
Misto, predominância de epitelióide	11 (40,7)
Epitelióide	13 (48,1)
Extensão extraocular, n (%)	
Negativa	49 (77,8)
Positiva	14 (22,2)
Sítio primário, n (%)	
Íris	7 (15,6)
Corpo ciliar	33 (73,3)
Coroide	5 (11,1)
Quantidade de histiócitos, n (%)	
Discreto	9 (14,1)
Intenso	55 (85,9)
Loop vascular, n (%)	
Presente	12 (19,0)
Ausente	51 (81,0)
Infiltração linfocítica, n (%)	
Ausente	40 (62,5)
Presente	24 (37,5)
Necrose, n (%)	
Não	11 (17,2)
Baixa	14 (21,9)
Alta	39 (60,9)

* Somente nos diagnósticos de melanoma

Tabela 3 - Descrição das características clínicas segundo diagnóstico e resultado dos testes de associação

Variável	Diagnóstico				Total		p
	Melanocitoma		Melanoma		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Tamanho do tumor							<0,001#
1/3 do olho	32	86,5	9	33,3	41	64,1	
2/3 do olho	4	10,8	9	33,3	13	20,3	
Olho inteiro	1	2,7	9	33,3	10	15,6	
Grau de pigmentação							<0,001
Baixo	2	5,4	15	55,6	17	26,6	
Alto	35	94,6	12	44,4	47	73,4	
Extensão extraocular							0,014
Negativa	32	88,9	17	63,0	49	77,8	
Positiva	4	11,1	10	37,0	14	22,2	
Sítio primário							0,656#
Íris	5	14,7	2	18,2	7	15,6	
Corpo ciliar	26	76,5	7	63,6	33	73,3	
Coroide	3	8,8	2	18,2	5	11,1	
Quantidade de histiócitos							<0,001*
Discreto	0	0,0	9	33,3	9	14,1	
Intenso	37	100,0	18	66,7	55	85,9	
Loop vascular							0,578*
Presente	6	16,7	6	22,2	12	19,0	
Ausente	30	83,3	21	77,8	51	81,0	
Infiltração linfocítica							0,133
Ausente	26	70,3	14	51,9	40	62,5	
Presente	11	29,7	13	48,1	24	37,5	
Necroses							0,026#
Não	10	27,0	1	3,7	11	17,2	
Baixa	8	21,6	6	22,2	14	21,9	

Teste qui-quadrado; * Teste exato de Fisher; # Teste da razão de verossimilhanças

5.3 Achados imunoistoquímicos

Os animais com diagnóstico de melanoma apresentaram estatisticamente maior grau de extensão do Melan-A ($p=0,022$), maiores graus de extensão e intensidade de HMB-45 ($p=0,002$ e $p=0,001$ respectivamente) e maiores expressões do Ki-67 ($p<0,001$).

Das 64 neoplasias melanocíticas, Melan-A reagiu em 34 casos e o HMB-45 em 20 casos (Figuras 5, 6 e 7). Em sete casos onde o Melan-A foi negativo, o HMB-45 obteve reação. E em 19 casos onde o HMB-45 foi negativo, o Melan-A foi positivo. Em 23 casos nenhum dos dois marcadores foi positivo (Tabela 5). O Melan-A e o HMB-45 expressaram mais frequentemente nos melanomas. O Melan-A reagiu em 18 (66,6%) melanomas e em 15 (40,5%) melanocitomas. O HMB-45 reagiu em 14 (51,8%) melanomas e em apenas 6 (16,2%) melanocitomas.

Houve positividade da COX-2 (Figuras 8 e 9) em quase todos os casos, apenas quatro não reagiram, sendo dois melanocitomas e dois melanomas. Não houve correlação entre a extensão ou intensidade da COX-2 entre melanocitomas e melanomas (Tabela 6). Não houve diferença estatisticamente significativa na extensão e intensidade do COX2 entre os tipos de células (Tabela 8) nos animais diagnosticados como melanoma ($p=0,094$ e $p=0,493$ respectivamente).

Os marcadores só apresentaram correlação estatisticamente significativa praticamente no mesmo marcador entre extensão e intensidade, ou seja, quanto maior a extensão maior a intensidade no mesmo marcador ($r>0$ e $p<0,05$). A extensão da COX-2 apresentou correlação direta estatisticamente significativa com Melan-A no total dos animais e nos animais com melanocitoma, porém, as correlações foram próximas de 0,35 ($r\approx 0,35$), o que indica correlação fraca a moderada, apesar de significativa ($p<0,05$).

Foi comum observar positividade da COX-2 em diferentes estruturas oculares não acometidas pelo tecido neoplásico como epitélio da córnea e conjuntiva, corpo ciliar e retina.

A expressão do Ki-67 (Figuras 10 e 11) foi avaliada pelo índice de células da razão correspondente ao número de núcleos positivos e negativos no campo selecionado. A média do índice nos melanomas foi significativamente maior com 37,8% comparado com os melanocitomas, com 15% (Tabela 5). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do Ki-67 (Tabela 7) entre os tipos celulares nos animais com diagnóstico de melanoma ($p=0,885$).

Tabela 4 - Descrição dos marcadores segundo diagnóstico e resultado dos testes comparativos

Variável	Diagnóstico						p
	Melanocitoma		Melanoma		Total		
	n	%	n	%	n	%	
MelanA Extensão							0,022
0	21	56,8	9	33,3	30	46,9	
1	5	13,5	4	14,8	9	14,1	
2	7	18,9	4	14,8	11	17,2	
3	3	8,1	7	25,9	10	15,6	
4	1	2,7	3	11,1	4	6,2	
MelanA Intensidade							0,107
0	21	56,8	9	33,3	30	46,9	
1	3	8,1	5	18,5	8	12,5	
2	10	27,0	9	33,3	19	29,7	
3	3	8,1	4	14,8	7	10,9	
HMB-45 Extensão							0,002
0	31	83,8	13	48,1	44	68,8	
1	4	10,8	7	25,9	11	17,2	
2	2	5,4	4	14,8	6	9,4	
3	0	0,0	3	11,1	3	4,7	
HMB-45 Intensidade							0,001
0	31	83,8	13	48,1	44	68,8	
1	6	16,2	6	22,2	12	18,8	
2	0	0,0	6	22,2	6	9,4	
3	0	0,0	2	7,4	2	3,1	
COX-2 Extensão							0,260
0	2	5,6	2	7,7	4	6,5	
1	8	22,2	1	3,8	9	14,5	
2	2	5,6	2	7,7	4	6,5	
3	5	13,9	4	15,4	9	14,5	
4	19	52,8	17	65,4	36	58,1	
COX-2 Intensidade							0,412
1	14	41,2	7	29,2	21	36,2	
2	7	20,6	6	25,0	13	22,4	
3	13	38,2	11	45,8	24	41,4	
Ki67							<0,001
Média (SD)	15,0 (19,8)		37,8 (23,1)		25,1 (24,0)		
Mediana			35,4 (1,1;				
(min,; max)	7,5 (0; 91,7)		83,4)		19,9 (0; 91,7)		

Teste Mann-Whitney

Tabela 5 - Correlação dos marcadores de todos animais e por diagnóstico, comparando intensidade e extensão da reação

Diagnóstico	Correlação		Ki67	MelanA Extensão	MelanA Intensidade	HMB-45 Extensão	HMB-45 Intensidade	COX-2 Extensão
Todos	MelanA	r	0,150					
	Extensão	p	0,250					
	MelanA	r	0,150	0,937				
	Intensidade	p	0,247	<0,001				
	HMB-45	r	0,333	0,217	0,155			
	Extensão	p	0,009	0,085	0,220			
	HMB-45	r	0,312	0,243	0,181	0,972		
	Intensidade	p	0,014	0,053	0,153	<0,001		
	COX-2	r	0,200	0,259	0,269	0,109	0,055	
	Extensão	p	0,130	0,042	0,034	0,401	0,669	
Melanocitoma	COX-2	r	0,092	0,129	0,140	0,015	-0,020	0,621
	Intensidade	p	0,505	0,333	0,294	0,912	0,883	<0,001
	MelanA	r	0,117					
	Extensão	p	0,510					
	MelanA	r	0,112	0,964				
	Intensidade	p	0,529	<0,001				
	HMB-45	r	0,193	0,018	-0,045			
	Extensão	p	0,275	0,916	0,792			
	HMB-45	r	0,197	0,023	-0,042	0,997		
	Intensidade	p	0,265	0,893	0,804	<0,001		
Melanoma	COX-2	r	0,070	0,340	0,357	0,024	0,023	
	Extensão	p	0,700	0,042	0,033	0,889	0,892	
	COX-2	r	-0,068	0,104	0,170	0,081	0,101	0,659
	Intensidade	p	0,716	0,559	0,337	0,649	0,568	<0,001
	MelanA	r	-0,082					
	Extensão	p	0,683					
	MelanA	r	0,058	0,907				
	Intensidade	p	0,774	<0,001				
	HMB-45	r	0,208	0,250	0,260			
	Extensão	p	0,298	0,208	0,190			
Melanoma	HMB-45	r	0,098	0,287	0,303	0,890		
	Intensidade	p	0,628	0,147	0,124	<0,001		
	COX-2	r	0,176	0,103	0,079	0,126	-0,101	
	Extensão	p	0,391	0,615	0,702	0,540	0,624	
	COX-2	r	0,166	0,126	0,055	-0,086	-0,248	0,571
	Intensidade	p	0,440	0,557	0,799	0,690	0,243	0,004

Correlação de Spearman

Tabela 6 - Comparação entre a taxa do Ki-67 e o tipo celular nos melanomas

Tipo de célula	média (DP)	mediana (mín.; máx.)	p
Misto, predominância fusiformes	33,3 (8,6)	29,3 (27,5; 43,2)	0,885
Misto, predominância epitelióides	40,4 (21,9)	37,4 (3,5; 77,4)	
Epitelióide	36,7 (27,1)	32,4 (1,1; 83,4)	
Total	37,8 (23,1)	35,4 (1,1; 83,4)	

Teste Kruskal-Wallis

Tabela 7 - Descrição da extensão e intensidade da COX2 segundo tipo de célula nos animais com diagnóstico de melanoma e resultado do teste comparativo

Variável	Tipo de célula						Total		p
	Misto, predominância de fusiformes		Misto, predominância de epitelióide		Epitelióide				
	n	%	n	%	n	%	n	%	
COX-2 Extensão									0,094
0	0	0,0	1	10,0	1	7,7	2	7,7	
1	0	0,0	1	10,0	0	0,0	1	3,8	
2	0	0,0	2	20,0	0	0,0	2	7,7	
3	1	33,3	2	20,0	1	7,7	4	15,4	
4	2	66,7	4	40,0	11	84,6	17	65,4	0,493
COX2-Intensidade									
1	1	33,3	4	44,4	2	16,7	7	29,2	
2	0	0,0	2	22,2	4	33,3	6	25,0	
3	2	66,7	3	33,3	6	50,0	11	45,8	

Teste Kruskal-Wallis

Figura 1 - Corte histológico do bulbo ocular apresentando melanocitoma uveal com extensão extraocular (H&E). Bar 4 μ m

Figura 2 - Corte histológico do bulbo ocular, após a técnica de *bleaching*, apresentando melanocitoma uveal com extensão extraocular (H&E). Bar = 5 μ m

Figura 3 - Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando células grandes poligonais repletas de melanina intracitoplasmática e células fusiformes com menor quantidade de melanina e baixo grau de atipia (H&E). Bar = 200 μ m

Figura 4 - Fotomicrografia de melanoma uveal de padrão celular misto, apresentando células epitelióides e fusiformes (H&E). Bar = 200 μ m

Figura 5 - Fotomicrografia de melanoma uveal apresentando forte positividade citoplasmática para o Melan-A (IHQ). Bar = 200 μ m

Figura 6 - Fotomicrografia de melanoma uveal fortemente positivo para HMB-45 (IHQ). Bar = 90 μ m

Figura 7 - Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando moderada positividade citoplasmática para Melan-A (IHQ). Bar = 100 μ m

Figura 8 - Fotomicrografia de melanoma uveal fortemente positivo para COX-2 (IHQ). Bar = 50 μ m

Figura 9 - Fotomicrografia de melanocitoma uveal fortemente positivo para COX-2 (IHQ). Bar = 50 μ m

Figura 10 - Fotomicrografia de melanoma uveal apresentando forte positividade nuclear do Ki-67 em diversas células neoplásicas (IHQ). Bar = 50 μ m

Figura 11 - Fotomicrografia de melanocitoma uveal apresentando ausência da expressão nuclear do Ki-67 (IHQ). Bar = 70 μ m

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas 64 neoplasias melanocíticas primárias da úvea canina e suas características histopatológicas e imunoistoquímicas foram associadas e um paralelo com os melanomas uveais em seres humanos foi discutido. Em ambas as espécies, essas são as neoplasias intraoculares mais frequentes (MOULD et al., 2002).

Não houve predisposição racial, achado esse que contrasta com os tumores melanocíticos epibulbares, onde existe uma forte predisposição do Pastor Alemão e do Labrador Retriever (WILLIS; WILKIE, 2001). A proporção entre machos e fêmeas foi igual, mostrando que também não existe predisposição sexual. Em seres humanos, o melanoma uveal é mais prevalente nos homens do que nas mulheres (SINGH; BERGMAN; SEREGARD; 2005). A maioria dos cães que apresentam melanoma oral ou cutâneo tem mais de dez anos de idade, podendo manifestar-se, contudo, a partir de um ano de idade (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). O presente estudo apresentou resultados similares, sendo a média de idade de dez anos, entretanto, houve variação de um a 15 anos de idade.

Durante muitos anos a nomenclatura das neoplasias melanocíticas nos cães vem sendo discutida. A princípio, na década de 1980, a classificação das neoplasias melanocíticas se aproximava muito da classificação realizada por Callender para os melanomas uveais no ser humano (DITERS et al. 1983). O termo “melanoma” costumava ser utilizado para descrever qualquer neoplasia melanocítica uveal no cão (RYAN; DITERS, 1984; BUSSANICH et al., 1987).

Com novas publicações nessa área, a classificação dessas neoplasias sofreu mudanças, levando em consideração as diferentes características histopatológicas entre as duas espécies. Friedman, Miller e Dubielzig (1989) e Mould et al. (2002) afirmaram que a classificação de Callender (1931) para os melanomas uveais em seres humanos é inapropriada para cães. As células fusiformes A não existem nos cães. As células fusiformes nos cães são compatíveis com as fusiformes B, porém menores e menos pleomórficas. As células grandes, redondas, repletas de melanina, que existem em diversos tumores de cães, não fazem parte da classificação de Callender, e assemelham-se muito com o melanocitoma humano (MOULD et al., 2002). Assim, os valores prognósticos da classificação de Callender não podem ser extrapolados para os melanomas em cães (FRIEDMAN; MILLER; DUBIELZIG, 1989; MOULD et al., 2002). Nos melanomas uveais em seres humanos, a predominância de células epitelioides indica pior prognóstico. Nos cães, o prognóstico não está relacionado com o tipo

celular e, até o presente momento, não há correlação do prognóstico com nenhuma característica histopatológica (GIULIANO et al., 1999; DUBIELZIG et al., 2010).

A dificuldade na classificação dos tumores uveais no cão origina-se do uso do termo “maligno”. Pelo critério de invasão ou destruição tecidual, muitos tumores deveriam ser classificados como malignos. Porém, a baixa taxa de metástase faz com que a correta classificação histológica seja voltada apenas para o risco de metástase (FRIEDMAN; MILLER; DUBIELZIG, 1989; MOULD et al., 2002). No presente estudo, com base na literatura veterinária mais recente, foi decidido classificar as neoplasias com características benignas como “melanocitomas” e as neoplasias com características de malignidade apenas de “melanoma” (DUBIELZIG et al. 2010). Dessa maneira, poderemos comparar os resultados não apenas entre as espécies, mas, entre os tumores benignos e malignos.

Os achados citológicos dos melanomas foram classificados como epitelioides, fusiformes ou mistos (apresentando ambos os tipos citológicos). Outras variações celulares estavam presentes, como células balonosas, entretanto, foram observadas apenas ocasionalmente em pequenas porções de alguns tumores. O padrão mais frequente foi o misto seguido do epitelioides. O padrão predominantemente fusiforme não foi observado. Esses achados são similares aos encontrados nos melanomas uveais em seres humanos, em que melanomas apresentando apenas células fusiformes estão presentes em um número de casos reduzido (FIGUEIREDO et al., 2003).

A úvea anterior foi a localização mais frequente dos tumores e em apenas cinco casos a coroide foi considerada como origem. Zimmermann (1967) afirmou que o melanoma de coroide no ser humano tem pior prognóstico comparado com aqueles que têm origem na íris ou no corpo ciliar, além de ser a localização mais frequente. Entretanto, no cão, o melanoma de coroide não é considerado mais agressivo que os localizados na úvea anterior, apesar da existência de relatos de metástase (HYMAN; KOCH; WILCOCK, 2002; MOULD et al., 2002).

A neoplasia melanocítica uveal mais comum no cão é o melanocitoma (DUBIELZIG et al., 2010), fato esse confirmado pelo presente estudo. Esse dado mostra um grande contraste entre as neoplasias melanocíticas no ser humano, em que a mais frequente é o melanoma. Na verdade, o melanocitoma intraocular é raro nos seres humanos e é considerado uma variação do nevo melanocítico. É mais frequentemente encontrado na porção anterior do nervo óptico, mas pode localizar-se em qualquer porção do tecido uveal, invadir tecidos locais e simular um melanoma. Por esse motivo, o tratamento é a enucleação em alguns casos (ODASHIRO et al., 20010). Nos cães, não há relatos de melanocitomas localizados no disco

óptico e não foi observado nenhum caso no presente estudo. Apesar de raros, os melanocitomas nos seres humanos têm similaridades com os melanocitomas caninos. Ambos são tumores densamente pigmentados em sua maioria e apresentam aspecto histológico similar. O glaucoma, em ambas as espécies, pode ser uma complicação desse tumor pela necrose e obstrução do ângulo iridocorneano (DEMIRCI et al., 2005; MOULD et al., 2002). Al-Hinai et al. (2004) referiram dois tipos de melanocitomas uveais em seres humanos, o tipo 1 apresentando células grandes poligonais densamente pigmentas, e o tipo 2 composto por células de citoplasma alongado apresentando menos melanina. Apesar dessa classificação não existir na literatura veterinária, no presente estudo ambos os tipos descritos acima foram observados com frequência.

Em ambas as espécies não há relatos de metástases por melanocitomas uveais, entretanto, a transformação maligna é uma possibilidade no cão e ser humano (DUBIELZIG et al., 2010; LI et al., 2010).

Nos melanomas, foi observado predomínio de casos apresentando extensão extraocular e tumores mais extensos. Essa maior agressividade está relacionada ao número de mitoses e índices Ki-67 mais elevados comparados com os melanocitomas. Porém, apesar de o melanocitoma ser considerado benigno, extensão extraocular pode ocorrer e clinicamente ser confundido com melanoma.

A diferenciação entre melanoma e melanocitoma no cão pode ser um desafio. Giuliano et al. (1999) demonstraram que animais que apresentaram melanomas tiveram menor expectativa de vida quando comparados com aqueles que apresentaram melanocitoma. Por esse motivo, o diagnóstico correto é de extrema importância. Segundo Dubielzig et al. (2010) e Giuliano et al. (1999), neoplasias melanocíticas nos cães apresentando no mínimo quatro figuras de mitose em dez campos de alta magnificação, são consideradas malignas, critério esse usado no presente estudo. Entretanto, ambos os autores afirmam que o alto número de figuras de mitose não pode ser usado para prever seu comportamento biológico.

Todos os melanocitomas apresentaram alto grau de pigmentação, com exceção de dois casos, sugerindo que neoplasias benignas tendem a possuir alto grau de melanina intracitoplasmática. Paglia et al. (2009) referiram que neoplasias uveais, no cão, apresentando alto grau de pigmentação tendem ser benignas. Dubielzig et al. (2010) afirmaram que conforme a célula progride para um perfil mais maligno, diminui a quantidade de melanina intracitoplasmática.

A simples presença de *loop* vascular, definido como um vaso sanguíneo completamente fechado, e de infiltrado linfocítico intratumoral no melanoma uveal, em seres

humanos, pode ser considerada como fator prognóstico desfavorável (FOLBERG et al., 1997; FIGUEIREDO et al., 2003). No presente estudo, a detecção do *loop* vascular foi similar nas neoplasias diagnosticadas como benignas e malignas. A presença do infiltrado linfocítico foi maior nas neoplasias consideradas malignas com 48,1% dos casos. Entretanto, foi observado infiltrado linfocítico presente em 29,7% dos tumores benignos. Esses dados revelam que a presença de *loop* vascular e de infiltrado linfocítico podem ser encontrados nas neoplasias melanocíticas benignas e malignas e, portanto, não são confiáveis para avaliar o comportamento biológico em cães.

Melanomas amelanóticos ou pouco diferenciados muitas vezes iludem o diagnóstico definitivo e uma série de neoplasias pode microscopicamente mimetizar o melanoma (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). Para facilitar o diagnóstico e torná-lo mais confiável, mais de um marcador imunoistoquímico deve ser utilizado (CHOI; KUSEWITT, 2003). No presente estudo, testamos dois marcadores para fins diagnósticos já estudados nos tumores melanocíticos da pele e cavidade oral nos cães e nos melanomas uveais em seres humanos (BURNIER JR; MCLEAN; GAMEL, 1991; RAMOS-VARA et al., 2000; SULAIMON; EHRHART; KITCHELL, 2002; CHOI; KUSEWITT, 2003; FERNANDES et al., 2007; LACROUX et al., 2012). Contudo, os marcadores Melan-A e HMB-45, até o presente momento, foram pouco estudados nas neoplasias melanocíticas dos cães.

O Melan-A foi o marcador com maior positividade, reagindo em 53,1% dos casos, enquanto o HMB-45 foi positivo em 31,2% dos casos. Em sete tumores em que o Melan-A foi negativo, o HMB-45 foi positivo. E em 19 casos onde o HMB-45 foi negativo, o Melan-A reagiu. Esses dados mostram que o Melan-A foi mais sensível que o HMB-45.

Em 23 (35,9%) dos casos, nenhum dos dois marcadores reagiu. Esse dado comprova a importância do uso de mais de um marcador no diagnóstico das neoplasias melanocíticas pouco diferenciadas. Por esse motivo, é recomendável usar conjuntamente marcadores com maior sensibilidade para melanócitos, como o marcador S-100, considerado bastante sensível para as neoplasias melanocíticas, porém com baixa especificidade, pois pode marcar uma série de outros tipos celulares (RAMOS-VARA et al., 2000).

No ser humano, o Melan-A é um dos principais marcadores para de melanócitos e apresenta alta especificidade e sensibilidade. No estudo de Fernandes et al. (2007), 91,7% dos 36 melanomas uveais estudados foram positivos. No presente estudo, o Melan-A reagiu em apenas 18 melanomas (66,6%). Esses dados sugerem que esse marcador é mais sensível no melanoma uveal em seres humanos quando comparado com cães.

O Melan-A e o HMB-45 foram mais positivos nos melanomas quando comparados com os melanocitomas. A maior positividade do Melan-A nas neoplasias melanocíticas com maior característica histológica de malignidade já havia sido descrita por Smedley et al. (2011b), entretanto, não há indicativo que esse marcador possa predizer o comportamento biológico (LACROUX et al., 2012).

A expressão do HMB-45 foi menor quando comparada com os tumores melanocíticos em seres humanos, em que o HMB-45 reagiu 100% dos 33 casos estudados (BURNIER JR; MCLEAN; GAMEL, 1991). Sulaimon, Kitchell e Ehrhart (2002) afirmaram que a expressão do HMB-45 no cão poderia ser maior se fosse realizado um pré-tratamento com permanganato de potássio, técnica essa não utilizada neste estudo. A dificuldade de se chegar a um consenso sobre a especificidade e a sensibilidade dos marcadores deve-se à variedade de resultados obtidos por diferentes estudos (RAMOS-VARA et al., 2000; SULAIMON; EHRHART; KITCHELL, 2002; LACROUX et al., 2012).

Algumas considerações devem ser feitas quando comparados os resultados dos estudos. Diferenças entre as amostras podem alterar o resultado. Por exemplo, tecidos com diferentes tempos de fixação podem mostrar diferentes resultados tanto na positividade, extensão e intensidade da reação. Outro desafio, principalmente na medicina veterinária, é a possibilidade de haver menor reação nos tecidos caninos comparado com seres humanos dependendo do anticorpo utilizado (RAMOS-VARA et al., 2000).

No presente estudo, houve positividade da COX-2 em quase todos os casos, apenas 4 não reagiram, sendo dois melanocitomas e dois melanomas. Não houve correlação entre a extensão ou intensidade do marcador COX-2 entre melanocitomas e melanomas. Esses dados revelam grande contraste com o estudo de Paglia et al. (2009), em que apenas 3,5% dos tumores melanocíticos uveais obtiveram expressão da enzima.

Foi comum observar positividade da COX-2 em tecidos oculares que não apresentaram envolvimento pelo tecido neoplásico, como córnea e corpo ciliar. Segundo Paglia et al. (2009), esse achado pode ser encontrado em olhos inflamados sem a presença de neoplasia e até em olhos normais.

Como a marcação da COX-2 foi positiva nos melanomas e nos melanocitomas, não foi possível classificar os tumores como benignos ou malignos apenas pela imunoistoquímica. No estudo de Pires et al. (2010), os melanomas cutâneos em cães obtiveram maior positividade para COX-2 quando comparados com melanocitomas, contrastando com os resultados aqui obtidos.

Foi observada presença de histiócitos na maioria dos casos estudados. Isso pode explicar, em parte, a alta positividade da COX-2 nos tumores examinados. A presença de macrófagos intratumorais pode aumentar a expressão da COX-2 nas neoplasias melanocíticas. É possível que as citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos possam ter papel na regulação da expressão da COX-2 pelas células neoplásicas (PIRES et al., 2011).

Figueiredo et al. (2003) relacionaram a alta expressão e intensidade do COX-2, nos melanomas uveais em seres humanos, com maior probabilidade de óbito. Como não houve diferença estatística entre o melanoma e o melanocitomas no presente estudo, podemos concluir que COX-2 não é um bom marcador na previsão do comportamento biológico das neoplasias melanocíticas uveais do cão. Essa conclusão pode ser sustentada pela conhecida baixa taxa de metástase do melanoma uveal do cão e pela alta positividade na maioria dos casos examinados nesse estudo.

Em seres humanos, melanomas uveais apresentando predominantemente células epitelioides apresentam pior prognóstico. Figueiredo et al. (2003) mostraram associação estatisticamente relevante entre a maior positividade da COX-2 nessas células comparado com melanomas com predominância de células fusiformes. No presente estudo, não houve diferença estatística do tipo celular e a expressão do COX-2, corroborando com o argumento que, em cães, o tipo celular não pode ser usado como indicativo prognóstico (GIULIANO et al., 1999).

Martinez et al. (2011) mostraram que o COX-2, em cães, é mais expresso nos melanomas orais comparado aos cutâneos. Esse dado pode estar relacionado ao pior prognóstico dos melanomas orais. Contudo, a alta positividade do COX-2 no presente estudo contrasta com esses dados, mostrando, mais uma vez, que a alta expressão do COX-2 no melanoma uveal canino não pode ser correlacionada com o prognóstico, uma vez que a taxa de metástase é significativamente menor quando comparado com os melanomas da cavidade oral (MOULD et al. 2002; BERGIN et al., 2012).

A alta porcentagem de positividade da COX-2 nos melanocitomas pode explicar em parte a capacidade que esse tumor tem de invadir tecidos adjacentes com possibilidade de extensão extraocular, uma vez que a alta expressão dessa enzima pode aumentar a atividade das metaloproteinases de matriz (TSUJII; KAWANO; DUBOUI, 1997).

O papel da COX-2 nas neoplasias melanocíticas no cão ainda não está claro, porém a demonstração de sua expressão, pode em futuros estudos, determinar a validade terapêutica dos inibidores da COX-2 nesses tumores.

O Ki-67 é um marcador de proliferação frequentemente utilizado para a determinação da atividade proliferativa de um tumor (ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999). No presente estudo, a expressão do Ki-67 nos melanomas foi significativamente maior, com média do índice Ki-67 de 37,8%, quando comparado com os melanocitomas, que obtiveram média de 15%. Esse dado mostrou-se útil para distinguir tumores malignos de benignos. Esse achado foi similar ao de Lacroux et al. (2012), nas neoplasias melanocíticas cutâneas em cães, em que as neoplasias com índice Ki-67 de 15% ou menos, foram consideradas benignas por apresentarem prognóstico favorável, apesar de em pequeno número de casos ter sido observada falta de correlação entre o índice e o comportamento biológico. Bergin et al. (2011) definiram que índice maior que 19,5% aumenta o risco de metástase nos melanomas orais.

Curiosamente, em três casos diagnosticados como melanocitomas, o índice do Ki-67 foi maior que 37%. Essas áreas podem significar transformação maligna, já sugerida por outros autores (MOULD et al., 2002; DUBIELZIG et al., 2010), porém nunca demonstrado por um marcador de proliferação.

Não houve diferença estatística do índice Ki-67 entre os tipos celulares nos melanomas, contrastando com os achados em seres humanos, onde o índice é maior quando há predominância de células epitelioides (KARLSON et al., 1996; LIANG et al., 2001). Esse resultado é similar ao da COX-2, mostrando importante diferença entre as duas espécies.

Os achados do índice Ki-67 nos melanomas uveais em seres humanos foram muito menores que a média do presente estudo. Karlson et al. (1996) correlacionaram índice Ki-67 maior que 6,5% com menor expectativa de vida. Infelizmente não foi possível realizar o *follow-up* dos pacientes do presente estudo pela diversidade de origens e por tratar-se de estudo retrospectivo. Contudo, a já conhecida baixa taxa de metástase do melanoma uveal dos cães faz a comparação dos índices do Ki-67 gerar grande contraste. O limiar do índice estipulado por Karlson et al. (1996) é muito menor comparado com os achados no presente estudo para os melanomas, que foi, na média, de 37,8% ou por Bergin et al. (2011), nos melanomas orais em cães, de 19,5%. Essa diferença pode estar relacionada com a metodologia subjetiva de contagem da positividade nuclear ou ser uma real diferença na taxa de proliferação dos melanomas nas duas espécies.

Os dados da pesquisa podem, no futuro, ajudar a elucidar o motivo da baixa taxa de metástase do melanoma uveal canino comparado com a mesma neoplasia no homem, assim como a grande diferença do comportamento do melanoma em diferentes tecidos no cão.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. O melanocitoma foi mais frequente que o melanoma. Não houve predisposição racial e animais idosos foram os mais acometidos.
2. O tipo celular mais frequentemente encontrado no melanoma foi o padrão misto (apresentando células fusiformes e epitelióide) seguido do epitelióide.
3. Comparado com o melanocitoma, o melanoma apresentou maior extensão extraocular, maior extensão do tumor, menor pigmentação e maior grau de necrose.
4. A presença de infiltrado linfocítico e *loop* vascular tanto no melanoma quanto no melanocitoma mostra que esse achado não tem importância prognóstica.
5. O Melan-A mostrou maior positividade que o HMB-45, entretanto, se ambos forem negativos, isso não exclui a possibilidade de a neoplasia ter origem melanocítica. A positividade do Melan-A e HMB-45 foi maior nos melanomas.
6. O melanoma apresentou índice Ki-67, na média, maior (37,8%) que o melanocitomas (15%). O marcador de proliferação Ki-67 pode ser usado para diferenciar ambas as neoplasias.
7. Áreas de transformação maligna dentro dos melanocitomas podem ser detectadas pelo marcador Ki-67.
8. O marcador COX-2 não mostrou diferença estatística entre o melanoma e o melanocitoma. Ambas as neoplasias obtiveram similar expressão. Esse dado pode sugerir que o COX-2 apresenta importante papel no desenvolvimento tumoral, mas não pode ser utilizado na diferenciação entre benigno e maligno nas neoplasias melanocíticas uveais em cães.
9. A análise estatística não mostrou diferença da positividade do Ki-67 e COX-2 entre as células fusiformes e epitelióides nos melanomas.
10. Os achados aqui discutidos revelam interessantes diferenças e similaridades entre as neoplasias melanocíticas uveais no homem e no cão.

REFERÊNCIAS

- ABUJAMRA, S.; ÁVILA, M.; BARSANTE, C.; FARAH, M. E.; GONÇALVES, J. O. R.; LAVINSKY, J. **Retina e vítreo: clínica e cirurgia**. São Paulo: Roca; 2000. p.1040.
- AL-HINAI, A.; ELDESTEIN, C.; BURNIER JR, M. N. Unusual case of melanocitoma. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 39, n. 4, p. 461-463.
- AYRES, B.; MAIA, H. S.; MOLLES, S.; BRAZUNA, A. Melanocitoma de corpo ciliar – Relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, n. 2, p. 333-5, 2004.
- BANERJEE, S. S.; HARRIS, M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. **Histopathology**, v. 36, n. 5, p. 387-402, 2000.
- BAPTISTA, C. S.; VILLAGRASA, M.; MARINHO, A. A. Standardised B-scan and A-scan echographic evaluation of spontaneous anterior uveal melanomas in the dog. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 322–330, 2006.
- BARNHILL, R. L. **Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma**. USA: Library of Congress, 1995. 294 p.
- BARRA, M. B. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 173-184, 2006.
- BARROS, P. S. M.; BURNIER JR, M. N.; RIGUEIRO, M.; SAFATLE, A. M. V. Melanoma bilateral da úvea em cão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 12, 1989. Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Anclivepa, 1989. p. 71.
- BARROS, P. S. M.; PERLMANN, E.; MARTINS, C.; ALVES, L. F. A.; ANTECKA, E.; BURNIER JR, M. N. Immunohistochemical study on pigmented intraocular canine lesions. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 51, p. 5160, 2010.
- BERGIN, I. L.; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G.; SPANGLER, W. L.; KIUPEL, M. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 41-53, 2011.
- BERRINGTON, A.; JIMBOW, K.; HAINES, D. M. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed paraffin embedded canine tumors. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 4, p. 455-461, 1994.
- BLANCO, P. L.; MARSHALL, J. C. A.; ANTECKA, E.; CALLEJO, S. A.; FILHO, J. P. S.; SARAIVA, V.; BURNIER JR, M. N. Characterization of ocular and metastatic uveal melanoma in an animal model. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 46, n. 12, p. 4376-4382, 2005.
- BOLON, B.; CALDERWOOD, M. B.; HALL, B. J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 2, p. 96-102, 1990.

BRUNELLI, A. T. J.; ORIA, A. P.; MARTINS, B. C.; CHAHUD, F.; ALMEIDA, D.; LAUS, J. L. Melanoma uveal bilateral em um cão da raça boxer: Relato de caso. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 5., 2004, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ANCLIVEPA, 2004. p. 123.

BURNIER JR, M. N.; MCLEAN, I. W.; GAMEL, J.W. Immunohistochemical evaluation of uveal melanocytic tumors expression of HMB-45, S-100, protein and neuron specific enolase. **Cancer**, v. 68, n. 4, p. 809-814, 1991.

BUSSANICH, N. M.; DOLMAN, P. J.; ROOTMAN, J.; DOLMAN, C. L. Canine uveal melanomas: series and literature review. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 23, n. 4, p. 15-422, 1987.

CALLENDER, G. R. Malignant melanotic tumors of the eye: a study of histologic types in 111 cases. **Transactions of the American Academy of Ophthalmology & Otolaryngology**, v. 36, p. 131-42, 1931.

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

CAZALOT, G.; RAYMOND-LETRON, I.; REGNIER, A. Choroidal melanoma presented as glaucoma in a dog: case report and review of the literature. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 159, n. 2, p. 74-78, 2008.

CHOI, C.; KUSEWITT, D. F. Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, Melan A immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 713-718, 2003.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 47, p. 200-202, 1941.

CUNHA, A. A. F.; RODRIGUES, N. H. T.; ALMEIDA, G. A.; PICACO B. C.; NETO, J. A. Melanoma de corpo ciliar e coróide: relato de caso. **Arquivo Brasileiro Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 193-196, 2010.

DEMIRCI, H.; MASHAYEKHI, A.; SHIELDS, C. L.; EAGLE JR, R. C. ; SHIELDS, J. A. Iris melanocytoma: clinical features and natural course in 47 cases. **American Journal of Ophthalmology**, v. 139, n. 3, p. 468-475, 2005.

DI CESARE, S.; MALONEY, S.; FERNANDES, B. F.; MARTINS, C.; MARSHALL, J. C.; ANTECKA, E.; ODASHIRO, A. N.; DAWSON, W. W.; BURNIER JR, M. N. The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 28-48, 2009.

DITERS, R. W.; DUBIELZIG, R. R.; AGUIRRE, G. D.; ACLAND, G. M. Primary ocular melanoma in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 4, p. 379-395, 1983.

DUBIELZIG, R. R. Ocular neoplasia in small animals. **Veterinary Clinics: small animal practice**, v. 20, n. 3, p. 837-848, 1990.

DUBIELZIG, R. R.; AGUIRRE, G. D.; GROSS, S. L.; DITERS, R. W. Choroidal melanomas in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 6, p. 582-585, 1985.

DUBIELZIG, R. R.; KETRING, K. L.; McLELLAN, G. J.; ALBERT, D. M. **Veterinary ocular pathology: A comparative review**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2010. p. 472.

ESSON, D.; FAHRER, C.; ZARFOSS, M. K.; DUBIELZIG, R. R. Suspected uveal metastasis of a nail bed melanoma in a dog. **Veterinary Ophthalmology**, v. 10, n. 4, p. 262-266, 2007.

FARAGONE, L. T. **Neoplasias oculares em cães: aspectos clínicos, cirúrgicos, histopatológicos e imunohistoquímicos**. 1999. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

FERNANDES, B. F.; ODASHIRO, A. N.; SARAIVA, V. S.; LOGAN, P.; ANTECKA, E.; BURNIER JR, M. N. Immunohistochemical expression of melan-A and tyrosinase in uveal melanoma. **Journal of Carcinogenesis**, v. 6, p. 1-6, 2007.

FERREIRA, J. L. M.; ROLIM, M. S. F. B.; LEITE, C. M. N.; MONTE, F. Q.; MEMORIA, R. M. Evidências obtidas de um caso de melanoma de íris recidivado. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 68, n. 1, p. 37-41, 2009.

FIGUEIREDO, A.; CAISSIE, A. L.; CALLEJO, S. A.; MCLEAN, I. W.; GOLD, P.; BURNIER JR, M. N. Cyclooxygenase-2 expression in uveal melanoma: novel classification of mixed-cell-type tumours. **Canadian Journal of Ophthalmology**, v. 38, n. 5, p. 352-356, 2003.

FINEMAN, M. S.; EAGLE, R. C.; SHIELDS, J. A.; SHIELDS, C. L.; POTTER P. Melanocytomalytic glaucoma in eyes with necrotic iris melanocytoma. **Ophthalmology**, v. 105, n. 3, p. 492-496, 1998.

FOLBERG, R.; LEACH, L.; VALYI-NAGY, K.; LIN, A. Y.; APUSHKIN, M. A.; AI, Z.; BARAK, V.; MAJUMDAR, D.; PE'ER, J.; MANIOTIS, A. J. Modeling the behavior of uveal melanoma in the liver. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 7, p. 2967-2974, 2007.

FOLBERG, R.; MEHAFFEY, M.; GARDNER, L. M.; MEYER, M.; RUMMELT, V.; PE'ER J. The microcirculation of choroidal and ciliary body melanomas. **Eye**, v. 11, n. 2, p. 227-238, 1997.

FRIEDMAN, D. S.; MILLER, L.; DUBIELZIG, R. R. Malignant canine anterior uveal melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 6, p. 523-525, 1989.

GALÁN, A.; MARTÍN-SUÁREZ, E. M.; MOLLEDA, J. M.; RAYA, A.; GÓMEZ-LAGUNA, J.; MARTÍN DE LAS MULAS, J. Presumed primary uveal melanoma with brain extension in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, n.6, p. 306-310, 2009.

GIULIANO, E. A.; CHAPPELL, R.; FISCHER, B.; DUBIELZIG, R. R. A matched observational study of canine survival with primary intraocular melanocytic neoplasia. **Veterinary Ophthalmology**, v. 2, n. 3, p. 185-190, 1999.

GOLDSCHMIDT, M. H. Pigmented lesions of the skin. **Clinical Dermatology**, v. 12, p. 507-514, 1994.

GOLDSCHMIDT, M. H.; DUNSTAN, R. W.; STANNARD, A. A.; VON TSCHARNER, C.; WALDER, E. J.; YAGER, J. A. Melanocytic tumors and tumor-like lesions. In: _____. **Histological classification of epithelial and melanocytic tumors of the skin of domestic animals**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998. p. 38-40.

GOULET, A. C.; EINSPHAR, J. G.; ALBERTS, D. S.; BEAS, A.; BURK, C. J.; BHATTACHARYYA, A.; BANGERT, J.; HARMON, J. M.; FUJIWARA, H.; KOKI, A.; NELSON, M. A. Analysis of cyclooxygenase 2 (COX-2) expression during malignant melanoma progression. **Cancer Biology and Therapy**, v. 2, n. 6, p. 713-718, 2003.

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

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; MANFREDI, M. J.; SORENMO, K. U. Assessment of cyclooxygenase-2 expression in canine hemangiosarcoma, histiocytic sarcoma, and mast cell tumor. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 3, p. 350-353, 2005.

HENDRIX, D. Diseases and surgery of the canine anterior uvea. In: GELATT, K. N. **Veterinary ophthalmology**. 4th ed. Ames: Blackwell Publishing, 2007. p. 812-850.

HU, D. N. Photobiology of ocular melanocytes and melanoma. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 3, p. 506-509, 2005.

HU, D. N.; SIMON, J. D.; SARNA, T. Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 639-644, 2008.

HYMAN, J. A.; KOCH, S. A.; WILCOCK, B. P. Canine choroidal melanoma with metastases. **Veterinary Ophthalmology**, v. 5, n. 2, p. 113-117, 2002.

JIANG, K.; BROWNSTEIN, S.; LAM, K.; BURNS, B.; FARMER, J. Usefulness of a Red Chromagen in the Diagnosis of Melanocytic Lesions of the Conjunctiva. **Journal of American Medical Association - Ophthalmology**, v. 132, n. 5, p. 622-629, 2014.

KADTHUR, J. C.; RAO, S.; SONNAHALLIPURA, B. M.; THIMMANAHALLI, D. S.; LAXMIKANTH, S. M. Prognostic value of Ki 67 proliferation antigen in canine malignant mammary gland tumours. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 1, p. 36-40, 2011.

KARLSSON, M.; BOERYD, B.; CARSTENSEN, J.; FRANLUND, B.; GUSTAFSSON, B.; KÅGEDAL, B.; SUN, X. F.; WINGREN, S. Correlations of Ki-67 and PCNA to DNA ploidy, S-phase fraction and survival in uveal melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 2, p. 357-62, 1996.

KATO, K.; NISHIMURA, R.; SASAKI, N.; MATSUNAGA, S.; MOCHIZUKI, M.; NAKAYAMA, H.; OGAWA, H. Magnetic resonance imaging of a canine eye with melanoma. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 2, p. 179-82, 2005.

KIRKWOOD, B. R.; STERNE, J. A. C. **Essential medical statistics**. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, EUA, 2006. p. 502.

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

KOJIMA, M.; MORISAKI, T.; UCHIYAMA, A.; DOI, F.; MIBU, R.; KATANO, M.; TANAKA, M. Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. **Annals of Surgical Oncology**, v. 8, n.5, p. 458-65, 2001.

KONRADE, K. A.; HOFFMAN, A.; SCHUBERT, C. S.; DUBIELZIG, R. R. A histologic series of secondary uveal melanomas in eleven dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 12, n. 6, p. 296, 2009.

LACROUX, I.; RAYMOND-LETRON, N.; BOURGES-ABELLA, M. N.; LUCAS, A.; DEVIERS, F.; SERRA, F.; DEGORCE-RUBIALES, M.; DELVERDIER, M. Study of canine cutaneous melanocytic tumours: evaluation of histological and immunohistochemical prognostic criteria in 65 cases. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, n. 8-9, p. 393- 401, 2012.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M. F.; NET, J. L.; LAGADIC, M.; DELVERDIER M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 139–147, 2001.

LI, H. K.; SHIELDS, C. L.; SHIELDS, J. A.; EAGLE JR, R. C.; MASON, J. O. Iridociliochoroidal melanoma arising from melanocytoma in a black teenager. **Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus**, v. 14, n. 2, p.178-80, 2010.

LIANG, J.; YI, C.; SCHILLING, H.; LI, X. Correlations of Ki-67 expression and histopathologic characteristics in uveal melanomas. **Yan Ke Xue Bao**, v. 17, n. 2, p. 114-117, 2001.

MAFEE, M. F. Uveal melanoma, choroidal hemangioma, and simulating lesions: role of MR imaging. **Radiologic Clinics of North America**, v. 36, n. 6, p. 1083-99, 1998.

MARSHALL, J. A.; FERNANDES, B. F.; DI CESARE, S.; MALONEY, S. C.; LOGAN, P. T.; ANTECKA, E.; BURNIER JR, M. N. The use of a cyclooxygenase-2 inhibitor (Nepafenac) in an ocular and metastatic animal model of uveal melanoma. **Carcinogenesis**, v. 28, p. 2053-2058, 2007.

MCLEAN, I. W.; BURNIER JR, M. N.; ZIMMERMAN, L. E.; JAKOBIEC, F. A. **Tumors of the eye and ocular adnexa**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1993. 322 p.

MCLEAN, I. W.; ZIMMERMAN, L. E.; EVANS, R. M. Reappraisal of callender's spindle A type of malignant melanoma of choroid and ciliary body. **American Journal of Ophthalmology**, v. 86, n. 4, p. 557-564, 1978.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**: com instrução para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo: Michalany, 1998. 295 p.

MIDENA, E.; BELVIS, V.; TOS, A. P. D.; ANTONINI, C. Isolated brain metastasis of malignant choroidal melanoma 27 years after enucleation. **Archives of Ophthalmology**, v. 117, n. 11, p. 1553- 1556, 1999.

MILLER, P. E. Uvea. In: MAGGS, D. J.; MILLER, P. E.; OFRI, R. (Ed.). **Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology**. 3rd ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008. p. 203-229.

MOULD, J. R. B.; PETERSEN-JONES, S. M.; PERUCCIO, C.; RATTO, A.; SASSANI, J. W.; HARBOUR, J. W. Uveal melanocytic tumors. In: PEIFFER JR, R. L.; SIMONS, K. B. (Ed.). **Ocular tumors in animals and humans**. Ames: Iowa State Press, Ames, 2002. p. 225-282.

MULLIGAN, R. M. Neoplastic disease of dogs. I. Neoplasms of melanin forming cells. **American Journal of Pathology**, v. 25, n. 2, p. 339-335, 1949.

ODASHIRO, M.; ODASHIRO, A.; LEITE, L.; MELO, M.; ODASHIRO, P.; MIJI, L.; ODASHIRO, D.; FERNANDES, P.; BURNIER JR, M. N. Melanocytoma of ciliary body and choroids simulating melanoma. **Pathology Research and Practice**, v. 206, n. 2, p. 130-133, 2010.

OZERDEM, U. Targeting pericytes diminishes neovascularization in orthotopic uveal melanoma in NG2 proteoglycan knockout mouse. **Ophthalmic Research**, v. 38, n 5, p. 251-254, 2006.

PAGLIA, D.; DUBIELZIG, R. R.; KADO-FONG, H. K.; MAGGS, D. J. Expression of cyclooxygenase-2 in canine uveal melanocytic neoplasms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 70, n. 10, p. 1284-90, 2009.

PATNAIK, A. K.; MOONEY, S. Feline melanoma: A comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 25, n. 2, p. 105-112, 1988.

PIRES, I.; GARCIA, A.; PRADA, J.; QUEIROGA, F. L. COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 2, p. 142-9, 2010.

PIRES, I.; PRADA, J.; GARCIA, A.; QUEIROGA, F. L. (2011). Tumour-Associated Macrophages (TAMs) and Cox-2 Expression in Canine Melanocytic Lesions. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/melanoma-in-the-clinic-diagnosis-management-and-complications-of-malignancy/tumour-associated-macrophages-tams-and-cox-2-expression-in-canine-melanocytic-lesions>>. Acesso em: 02 Jan. 2015.

PERLMANN, E.; BARROS, P. S. M.; FERNANDEZ, L.; DI CESARE, S.; BAKALIAN, S.; BURNIER JR, M. N. Histopathological evaluation of pigmented intraocular tumors in dogs. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 5, p. 5159, 2010.

PERLMANN, E. ; BARROS, P. S. M. ; TSOUKAS, S ; SOUZA, D. ; BALAKIAN, S.; FERNANDES, B. F. ; BURNIER JR, M. N. KI-67 as immunohistochemical marker to distinguish intraocular melanocytoma from melanoma in dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, p. 412, 2011.

PERRONE, E. A. **Análise histológica, imuno-histoquímica e da proliferação celular de neoplasias melanocíticas cutâneas caninas: estudo retrospectivo**. 2001. 109 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, n. 42, p.405–426, 2005.

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

ROELS, S.; TILMANT, K.; DUCATELLE, R. p53 expression and apoptosis in melanomas of dogs and cats. **Research Veterinary Science**, v. 70, n. 1, p. 19-25, 2001.

RYAN, A. M.; DITERS, R. W. Clinical and pathologic features of canine ocular melanomas. **Journal of American Medical Association**, v. 184, n. 1, p. 60-67, 1984.

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: Academic Press, 1993.

SHADDUCKJ, A.; ALBERT, M.; CRAFTJ, L.; NIEDERKORNJ, Y. Feline uveal melanoma model induced with feline sarcoma virus. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 20, n. 3, p. 606- 624, 1981.

SHEIDOW, T.G.; HOOPER, P. L.; CRUKLEY, C.; YOUNG, J.; HEATHCOTE, J. G. Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. **British Journal Ophthalmology**, v. 84, n. 7, p.750-6, 2000.

SIMPSON, R. M.; BASTIAN, B. C.; MICHAEL, H. T.; WEBSTER, J. D.; PRASAD, M. L.; CONWAY, C. M.; PRIETO, V. M.; GARY, J. M.; GOLDSCHMIDT, M. H.; ESPLIN, D. G.; SMEDLEY, R. C.; PIRIS, A.; MEUTEN, D. J.; KIUPEL, M.; LEE, C.-C. R.; WARD, J. M.; DWYER, J. E.; DAVIS, B. J.; ANVER, M. R.; MOLINOLO, A. A.; HOOVER, S. B.; RODRIGUEZ-CANALES J.; HEWITT S. M. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 27, p. 37-47, 2014.

SINGH, A. D.; BERGMAN, L.; SEREGARD, S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. **Ophthalmology Clinics of North America**, v. 18, n. 1, p. 75-84, 2005.

SMEDLEY, R. C.; LAMOUREUX, J.; SLEDGE, D. G.; KIUPEL, M. Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 32-40, 2011a.

SMEDLEY, R. C.; SPANGLER, W. L.; ESPLIN, D. G.; KITCHELL, B. E.; BERGMAN, P. J.; HO, H. Y.; BERGIN, I. L.; KIUPEL, M. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011b.

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

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cão. **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, n.2, p. 136-149, 2006.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, E. J.; EHRHART, E. J. Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 12, p. 162-8, 2002.

TAYLOR, G. N.; DOUGHERTTY, F.; MAYS, C. W.; LLOYD, R. D.; ATHERTON, R.; JEE, W. S. S. Radium-induced eye melanomas in dogs. **Radiation Research**, v. 51, n. 2, p. 261-373, 1972.

TRUCKSA, R.; MCLEAN, I. W.; QUINN, A. J. Intraocular canine melanocytic neoplasms. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 21, p. 85-88, 1985.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; DUBOIS, R. N. **Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential**. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, v. 94, n. 7, p. 3336-3340, 1997.

WEISSE, I.; FRESE, K.; MEYER, D. Benign melanoma of the choroid in a beagle: ophthalmological, light and electron microscopical investigations. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 6, p. 586-591, 1985.

WILCOCK, B. P.; PEIFFER JR, R. L. Morphology and behavior of primary ocular melanomas in 91 dogs. **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 418-424, 1986.

WILKERSON, M. J.; DOLCE, K.; DEBEY, B. M.; HEEB, H.; DAVIDSON, H. Metastatic balloon cell melanoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 32, n. 1, p. 31-36, 2003.

WILLIAMS, C. S.; SHENG, H.; BROCKMAN, J. A.; ARMANDLA, R.; SHAO, J.; WASHINGTON, M. K.; ELKAHLOUN, A. G.; DUBOIS, R. N. A cyclooxygenase-2 inhibitor (SC-58125) blocks growth of established human colon cancer xenografts. **Neoplasia**, v. 3, p. 428-36, 2001.

WILLIS, A. M.; WILKIE, D. A. Ocular oncology. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n. 1, p. 77-85, 2001.

ZIMMERMAN, L. E. Changing concepts concerning the malignancy of ocular tumors. **Archives of Ophthalmology**, v. 78, n. 2, p. 166-173, 1967.