NÁYRA VILLAR SCATTONE

**Comparação da metilação global do DNA em melanomas
melânicos e amelânicos da cavidade oral de cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo

2019

NÁYRA VILLAR SCATTONE

**Comparação da metilação global do DNA em melanomas
melânicos e amelânicos da cavidade oral de cães**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Scattone, Náyra Villar
Comparação da metilação global do DNA em melanomas
melânicos e amelanicos da cavidade oral de cães /
Náyra Villar Scattone. -- São Paulo, 2019.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Lucia Zaidan Dagli.

Descritores: 1.Neoplasias 2.Cães 3.Metilação de
DNA 4.Epigenética 5.Melanoma oral 6.Melanina

USP/FM/DBD-422/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

A minha família: Rosely, Vitor e Adelaide.

Agradecimentos:

Agradeço imensamente a minha orientadora Maria Lucia Zaidan Dagli pela oportunidade e por todo o aprendizado nesse período.

Professora Ana Paula Loureiro agradeço a colaboração e a receptividade. Também sou grata aos seus alunos Josiane e Everson pelo auxílio no laboratório durante o período que estive trabalhando no departamento de análises clínicas e toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Agradeço o apoio dos meus amigos no laboratório por dividirem comigo todas as preocupações e alegrias dessa fase final do mestrado: Andréa, Marcia Nagamine e Tatiana. Também nunca vou esquecer as pessoas que me receberam com muito carinho no início: Marguiti, Daniel, Ivone. Karen obrigada por todas as conversas que duravam horas, obrigada pelo apoio.

Tati só tenho a agradecer por toda a ajuda nessa etapa. Obrigada pela sua amizade, considero você uma irmã que a vida trouxe de presente.

Ka obrigada pela parceria e por me ensinar oncologia veterinária, mas acima de tudo isso, agradeço por eu ter ganhado uma grande amiga com isso tudo.

Aos meus amigos Darlan e Mari, obrigada por todo o apoio e atenção não apenas nesse período, mas em toda minha vida profissional. Agradeço a oportunidade de aprender veterinária com vocês desde a faculdade, até hoje.

Obrigada Rê, Ana, Sol e Ryan. O incentivo e o carinho de vocês todos os dias foi essencial para que eu conseguisse concluir essa fase.

Morg, Mi e Gabi, obrigada meninas por estarem presentes em mais uma etapa da minha vida, de tantas outras que já vivemos juntas.

Agradeço a minha família por todo apoio, ajuda e paciência. Obrigada mãe, Vitor e vó por estarem ao meu lado em tudo, amo vocês. Tio e Co, de onde estão sei que me iluminam sempre. Agradeço também aos meus bichinhos: Indra, Luna, Flora, Lola, Salsa, Zouk, Mila e Lili, meus companheiros sempre.

RESUMO

Scattone NV. *Comparação da metilação global do DNA em melanomas melânicos e amelânicos da cavidade oral de cães* [dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O melanoma oral é um câncer agressivo com grande importância para a oncologia humana e para a veterinária. Conhecer as alterações genéticas e epigenéticas das neoplasias é essencial para prever o comportamento biológico e instituir novos tratamentos para esta doença e, através da oncologia comparativa, é possível beneficiar tanto os seres humanos quanto animais com os resultados dessas pesquisas. O objetivo deste trabalho é comparar a metilação global do DNA em melanomas orais melânicos e amelânicos de cães, quantificar a proliferação celular, e quantificar de melanina nos melanomas melânicos, correlacionando-os. Para tanto, dois estudos foram realizados. No primeiro estudo, foram coletadas amostras de tecido tumoral de 18 cães, sendo 9 casos de melanomas amelânicos e 9 de melanomas melânicos. Nas amostras de tecidos tumorais foram realizadas marcações imunoistoquímica com anticorpo anti 5 metilcitosina e Ki67, para análise da metilação global do DNA, e a proliferação celular respectivamente. A quantidade de melanina dos tumores foi avaliada utilizando sistema de análise de imagens. Além disso, amostras de sangue periférico desses mesmos pacientes foram coletadas para análise da metilação global de DNA em leucócitos por meio da técnica de HPLC. No segundo estudo, foram avaliadas 10 amostras de melanomas melânicos, e 10 amostras de melanomas amelânicos e, por meio de imunoistoquímica, também foi comparada a metilação global do DNA, quantificada a proliferação celular e a quantidade de melanina. Combinando resultados dos dois estudos, isto é, incluindo dados de 38 amostras de melanomas orais, sendo 19 melânicos e 19 amelânicos, foi observado que o padrão de metilação global do DNA foi diferente entre melanomas melânicos e amelânicos, sendo que os amelânicos sinalizaram hipometilação. Além disto, a quantificação de células positivas para Ki67 nos melanomas amelânicos foi significativamente maior do que nos melanomas melânicos. As amostras de tecido dos melanomas melânicos apresentaram diferença significativa na quantidade de melanina quando comparadas entre si. Não houve diferença significativa entre o padrão de metilação global do DNA em

leucócitos de cães portadores de melanomas melânicos e amelânicos, quando analisadas 9 amostras de melanomas melânicos e 9 amostras de melanomas amelânicos. Futuros estudos com a metilação de genes específicos nos melanomas orais de cães, e com metilação global do DNA poderão contribuir com mais informações em relação ao prognóstico e novos tratamentos desta doença.

Descritores: Neoplasias; Cães; Metilação de DNA; Epigenética; Melanoma oral; Melanina.

ABSTRACT

Scattone NV. *Comparison of global DNA methylation in melanotic and amelanotic oral melanomas in dogs* [dissertation] São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Oral melanoma is an aggressive and resistant cancer of great importance to human and veterinary oncology. Knowledge of the genetic and epigenetic modifications of neoplasms is essential to predict biological behavior and develop new treatments for this disease. Research in the field of comparative oncology, contribute the health of humans and animals. The objective of this study was to compare the global DNA methylation in oral melanotic melanomas and oral amelanotic melanomas in dogs, to quantify the cellular proliferation, and to quantify the melanin in canine oral melanomas, correlating these data. For that purpose, two studies were performed. In the first study, tumor tissue samples were collected from 18 dogs, including 9 dogs with melanotic melanomas and 9 dogs with amelanotic melanomas. In the tumor tissue samples, immunohistochemistry was performed for global DNA methylation analysis and for cell proliferation analysis with anti-methylcytosine antibody and Ki67 antibody, respectively. In addition, quantification of melanin in tumor tissues was performed using an image analysis system. Furthermore, peripheral blood was collected from same dogs and global DNA methylation in leukocytes was analyzed by HPLC. The second study included 10 samples of oral melanotic melanoma and 10 samples of amelanotic melanomas, in which were analyzed cell proliferation, global DNA methylation and amount of melanin in tumor tissue samples. Combining results from the two studies, that is, including data from 38 oral melanoma samples, 19 melanotic and 19 amelanotic, it was observed that the overall DNA methylation pattern was different between melanotic and amelanotic melanomas, with amelanotic signaling hypomethylation. In both studies In addition, the quantification of Ki67-positive cells in amelanotic melanomas was significantly higher than in melanotic melanomas. Tissue samples of melanotic melanomas showed significant difference in the amount of melanin when compared to each other. There was no significant difference between the global DNA methylation pattern in leukocytes of dogs with melanotic and amelanotic melanomas, when 9 samples of melanotic melanomas and 9 samples of amelanotic melanomas were

analyzed. Future research concerning methylation of specific genes in canine oral melanomas, and covering global DNA methylation could contribute with more information regarding prognosis and new treatments of this disease.

Descriptors: Neoplasms; Dogs; DNA methylation; Epigenetic; Oral melanoma; Melanin.

Lista de abreviaturas e siglas

TRP I (proteína relacionada a tirosinase 1

TRP II (proteína relacionada a tirosinase

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

IHQ – Imunoistoquímica

5MetCyt – Anticorpo 5-metil citosina

DNMTs – DNA metiltransferases

LINEs – Long interspersed elements

SINEs – Short interspersed elements

MBDP – Proteína de domínio de ligação ao metil

HDACs- Histonas deacetilases

HPLC-DAD– High Performance Liquide Chromatography- diode array detection

dC – Deoxicitidina

5mC – Citosinas metiladas

LC-MS – Cromatografia Líquida associada ao espectometria de massas

DAB – Diaminobenzidina

AEC - 3-amino-9-etilcarbazol

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema representativo do processo de pigmentação da pele.....	3
Figura 2. Biossíntese da melanina.....	4
Figura 3. Representação esquemática da metilação.....	12
Figura 4: Representação gráfica da avaliação da quantidade de amostras coletadas entre o grupo de fêmeas e de machos.....	26
Figura 5: Melanoma melânico oral de cão. Coloração H.E.....	27
Figura 6: Melanoma amelanico oral de cão. Imunoistoquímica. Melan A.....	27
Figura 7: Melanoma melânico oral de cão. Coloração H.E.....	27
Figura 8: Melanoma melânico oral de cão. Coloração H.E.....	27
Figura 9: Representação gráfica da distribuição de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de H.E.	28
Figura 10: Representação gráfica da avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães, pela coloração de Fontana Masson	29
Figura 11: Representação gráfica da avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães, pela coloração de HE e de Fontana Masson	30
Figura 12: Melanoma melânico oral de cão. Coloração com Fontana Masson.....	30
Figura 13: Melanoma melânico oral de cão. Coloração com H.E.....	30
Figura 14: Melanoma amelanico oral de cão. Imunoistoquímica com anticorpo ki67 e cromógeno DAB	31
Figura 15: Melanoma melânico oral de cão. Imunoistoquímica com anticorpo ki67 e cromógeno AEC.....	31
Figura 16: Representação gráfica do índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelanicos e melânicos.....	32
Figura 17: Melanoma amelanico oral de cão. Imunoistoquímica com 5-metilcitosina e cromógeno AEC.	33
Figura 18: Melanoma melânico oral de cão. Imunoistoquímica com 5-metilcitosina e cromógeno AEC.	33
Figura 19: Representação gráfica da distribuição da metilação de DNA em melanomas amelanicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunoistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte	34
Figura 20: Representação gráfica da distribuição da metilação global de DNA de leucócitos no grupo controle, grupo de melanomas amelanicos e grupo de melanomas	

melânicos de cães. Marcações apresentadas por meio de avaliação de HPCL em (%).....35

Figura 21: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina e ki67 por IHQ, % 5 metilcitosina por HPLC em melanomas amelanicos de cães37

Figura 22: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina e ki67 por IHQ, % 5 metilcitosina por HPLC, e % de melanina em melanomas melânicos de cães39

Figura 23: Representação gráfica da avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães, pela coloração de HE.....40

Figura 24: Representação gráfica do Índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelanicos e melânicos.....42

Figura 25: Representação gráfica da metilação de DNA em melanomas amelanicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunoistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte.....44

Figura 26: Representação gráfica da avaliação da metilação de DNA em melanomas amelanicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunoistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte.....46

Figura 27: Representação gráfica do Índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelanicos e melânicos.....48

Figura 28: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina por IHQ e por Ki67 em melanomas amelanicos de cães.....49

Figura 29: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina por IHQ, Ki67 e melanina em melanomas melânicos de cães..... 51

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação para tumores orais em animais domésticos	8
Tabela 2: Protocolo de coloração de Hematoxilina e Eosina	19
Tabela 3: Lista dos anticorpos primários utilizados na imunoistoquímica	21
Tabela 4: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE.	28
Tabela 5: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de Fontana M.	29
Tabela 6: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação Ki67 de melanomas de cães	32
Tabela 7: Médias $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.....	34
Tabela 8: Médias (%) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA no grupo controle, grupo de melanomas amelanicos e grupo de melanomas melânicos de cães	36
Tabela 9: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE.....	41
Tabela 10: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação com Ki67 de melanomas de cães.....	42
Tabela 11: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.....	44
Tabela 12: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.....	46
Tabela 13: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação anti-Ki67 de melanomas de cães.....	48

Lista de Anexos

ANEXO 1: Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

ANEXO 2: Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	02
2.1. Melanoma	02
2.2. Epigenética	10
3. Justificativa	14
4. Objetivos	14
4.1. Objetivos gerais	14
4.2. Objetivos específicos	15
5. Materiais e métodos	15
5.1. Aspectos éticos	15
5.2. Amostras clínicas	16
5.2.1. Amostras de sangue periférico	17
5.2.2. Amostras de tecidos tumorais	17
5.3. Histotécnica	18
5.3.1. Coloração Hematoxilina e Eosina	18
5.3.2. Coloração Fontana Masson	19
5.3.3. Imunoistoquímica	20
5.4. Aquisição de imagens e contagem da marcação imunoistoquímica	22
5.5. Padronização do sistema de quantificação de melanina nos melanomas melânicos	22
5.6. HPLC (<i>High Performance Liquide Chromatography</i>)	23
6. Análise estatística	25
7. Resultados	26
7.1. 1. Amostragem do estudo prospectivo.....	27

7.1.2. Quantificação de melanina em melanomas melânicos no estudo prospectivo	28
7.1.3. Proliferação celular nas amostras no estudo prospectivo.	30
7.1.4. Quantificação da metilação global do DNA por imunoistoquímica no estudo prospectivo	33
7.1.5 Quantificação da metilação global do DNA por HPLC no estudo prospectivo	35
7.1.6. Análise da correlação de Pearson no estudo prospectivo..	36
7.2. Estudo retrospectivo	40
7.2.1. Avaliação da concentração de melanina em melanomas melânicos em cães no estudo retrospectivo	40
7.2.2. Avaliação do índice de proliferação celular em melanoma oral de cães do estudo retrospectivo	41
7.2.3. Avaliação da metilação global do DNA em melanoma oral melânico e amelanico de cães do estudo retrospectivo	43
7.3. Análise com todas as amostras (dos estudos retrospectivo e prospectivo)	45
7.3.1. Comparação da avaliação da metilação global de DNA por meio de imunoistoquímica com 5-metilcitosina em melanomas amelanicos e melânicos em cães, nas amostras do estudo retrospectivo e prospectivo	45
7.3.2. Comparação da avaliação da proliferação celular por meio de imunoistoquímica com ki67 em melanomas amelanicos e melânicos em cães, nas amostras do estudo retrospectivo e prospectivo.....	47
7.3.3. Análise da correlação de Pearson com as amostras do estudo retrospectivo e prospectivo	50
8. Discussão	51
9. Conclusões	56
10. Referências bibliográficas	57
11. Anexos	66

1. INTRODUÇÃO

A medicina humana e veterinária podem compartilhar resultados de estudos científicos para compreender mais rapidamente o comportamento biológico das neoplasias e favorecer tanto humanos quanto animais por meio da oncologia comparativa. Os cães são considerados bons modelos para o estudo do câncer porque apresentam a doença espontaneamente, possuem genes semelhantes aos dos humanos e respondem de forma similar (SULTAN; GANAIE, 2018). Além disso, cães e humanos convivem no mesmo ambiente, o que pode influenciar no desenvolvimento e progressão da doença. (NISHYA, *et al.*, 2016, HERNANDEZ *et al.*, 2018).

Os cães desenvolvem melanomas muito semelhante aos dos humanos, e isso enfatiza a importância do modelo canino pré-clínico. (GILLARD *et al.*, 2014; SIMPSON *et al.*, 2014). Os cânceres comuns entre os humanos e cães incluem diferentes tipos histológicos de sarcomas, linfomas, leucemias, carcinomas, tumores intracranianos e melanomas (SCHIFFMAN; BREEN, 2015).

Compreender as alterações genéticas e epigenéticas das neoplasias é de extrema importância para prever o comportamento biológico e a eficácia de terapia do câncer (YOU; JONES, 2012). O melanoma é um câncer agressivo pouco investigado nos últimos anos quanto as características epigenéticas. A inativação epigenética de genes supressores de tumor é relacionada a iniciação, promoção e progressão tumoral, e esta foi a primeira alteração epigenética estudada no melanoma, ocorrendo principalmente pela metilação do DNA de regiões promotoras específicas (MARTINEZ-CARDÚS *et al.*, 2015).

A metilação é essencial para regular a expressão genica durante a transcrição em células saudáveis. A metilação do DNA ocorre pela adição de um grupo metila (CH₃) ao carbono 5 da citosina, localizada imediatamente após uma guanina, em regiões denominadas sítios CpG; a enzima metiltransferase (DNMTs) catalisa essa ligação. Em células cancerígenas há repressão transcricional, causando hipometilação global no genoma. A hipometilação do DNA global favorece a expressão de proto oncogenes, e a hipermetilação de genes específicos pode suprimir a expressão de genes supressores de tumor. Ambas situações podem favorecer a carcinogênese, e a progressão tumoral. (MCGAVIN; ZACHARY, 2013).

Sabe-se que durante a carcinogênese ocorre a hipermetilação do DNA de local específico e a de hipometilação global de DNA, e esta perda global de metilação do DNA tem sido proposta como um biomarcador válido para o câncer. Nos últimos anos muitas pesquisas estão sendo feitas sobre a hipermetilação específica do DNA, no entanto, estudos têm mostrado que hipometilação global também pode ser útil como um marcador clínico e existem muitas abordagens que podem ser aplicados para a análise de metilação de DNA global. (TORAÑO *et al.*, 2012). Segundo Ehrlich, M. (2009) a expectativa é que nos próximos anos, provavelmente a hipometilação do DNA será usada como marcador para detecção e prognóstico do câncer. Não há estudos sobre o padrão de metilação global dos melanomas em cães.

Uma vez que estudos epigenéticos em melanomas são escassos na veterinária este trabalho pretende analisar o perfil de metilação global do DNA em melanomas melânicos e amelanicos de cães, procurando correlacionar os dados com o índice de proliferação celular nessas mesmas neoplasias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MELANOMA

Os melanócitos são células dendríticas derivadas de uma população germinativa de melanoblastos originários de células da crista neural (SMITH *et al.* 2002). Os melanócitos estabelecem uma relação com queratinócitos quando atingem a camada basal da epiderme. Para cada melanócito existem cinco queratinócitos ao seu redor que formam junções de aderência e regulatórias por meio de moléculas de adesão (TEIXEIRA, *et al.*, 2014). (Figura 1).

Na maioria das espécies, os melanoblastos migram durante a embriogênese para diferentes sítios (camada basal da epiderme, derme, entre os folículos pilosos, mucosas, olhos) e começam o processo de melanização imediatamente antes ou logo depois de alcançar seu destino (OLIVEIRA; JUNIOR, 2002). A melanogênese é o processo de síntese da melanina e ocorre no interior das organelas chamadas melanossomas. Existem tipos diferentes de melanina: a eumelanina apresenta pigmento castanho-preto; a feomelanina

pigmento vermelho-amarelo; e a neuromelanina é um subtipo da eumelanina, que pode ser encontrado no sistema nervoso (TEIXEIRA, et al., 2014). (Figura 1).

A enzima tirosinase multifuncional e outras proteínas reguladoras, também membros da família tirosinase: TRP I (proteína relacionada a tirosinase 1), TRP II (proteína relacionada a tirosinase 2) iniciam o processo de melanogênese (ORLOW, 1994). A síntese da melanina começa com oxidação enzimática de L-tirosina à L-Dopa e oxidação de L-Dopa à dopaquinona. A eumelanina se forma com a transformação espontânea da dopaquinona em leucodopacromo e dopacromo. A feomelanina se dá pela conjugação de dopaquinona com cisteína ou glutatona (OLIVEIRA; JUNIOR, 2002). (Figura 2)

Quando a síntese de melanina se completa, os melanossomas são transferidos para a região perinuclear dos melanócitos até as pontas de seus dendritos, e depois são transferidos aos queratinócitos (Figura 1). Os queratinócitos podem fagocitar algumas porções de dendritos carregados de melanina ou melanossomas livres no espaço intracelular (OLIVEIRA; JUNIOR, 2002).

O excesso de produção de melanina no organismo é denominado hiperpigmentação, e a falta de produção de melanina é denominada hipopigmentação. Ambas podem provocar diferentes patologias nos seres humanos e nos animais domésticos (TEIXEIRA, et al., 2014).

Figura 1. Esquema representativo do processo de pigmentação da pele. Adaptado. (Fuller, B.; 2004)

Figura 2. Biossíntese da melanina. Adaptado. (MONTEIRO, 2010.)

O melanoma é um tumor maligno originado nos melanoblastos e melanócitos da neuroectoderme (HEAD *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2002), e pode ser melânico ou amelânico (VERHAERT, 2001). O melanoma em mucosas tem características epidemiológicas diferentes do melanoma cutâneo, e a maioria ocorre em mucosas da cabeça e pescoço, anal e genital (POSTOW, *et al.*, 2012). O primeiro caso inglês de melanoma em mucosa foi relatado por Lincoln em 1885 (SEETHARAMU *et al.*, 2010), e o primeiro caso em cabeça e pescoço em 1968 (GRAVIEL *et al.*, 2011)

O melanoma cutâneo pode ocorrer em toda a superfície cutânea nos cães o melanoma em mucosas é o mais comum, sendo a mucosa oral o local mais acometido ((VERHAERT, 2001, SMITH *et al.*, 2002). Na cavidade oral dos cães 55% dos casos ocorrem na gengiva (VERHAERT, 2001), mas a mucosa oral e labial, o palato mole e duro, a face dorsal da língua, as amígdalas e a faringe também podem ser afetadas. Quando localizado nas junções muco-cutâneas tende a ser de elevada agressividade (SMITH *et al.*, 2002).

Alguns estudos avaliaram melanomas orais e cutâneos nos cães: Teixeira (2011) estudou aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares de melanomas de cavidade oral de cães; Bergin *et al.* (2011) avaliaram o prognóstico através do valor limite do ki67 em melanomas orais de cães, Requicha (2010) avaliaram neoplasias da cavidade oral do cão em um estudo retrospectivo de 14 anos; Bergman (2007) revisou aspectos clínicos e diagnósticos nos melanomas orais de cães; Ramos-Vara *et al.* (2000) realizaram

um estudo retrospectivo de 338 melanomas orais em cães, e em 129 analisaram aspectos clínicos, histológicos e imunoistoquímicos. Fernandes *et al.*, (2015) avaliaram a frequência de neoplasias cutâneas em cães no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia entre 2000-2010; Costa *et al.*, (2015) estudaram os tipos histopatológicos de melanomas cutâneos em cães em Palmas, TO; Scattone *et al.*, (2014) avaliaram a casuística de tumores cutâneos em cães nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico de São Paulo; Souza *et al.*, (2006) fizeram estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães; Camargo (2005) estudou 58 casos de neoplasias melanocíticas cutâneas em cães; Rolim *et al.*, (2012) realizaram 161 diagnósticos de neoplasias melanocíticas no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O melanoma é o tumor maligno da cavidade oral mais frequente no cão (CHENIER, S. *et al.*, 1997), representa entre 30 a 40% de todas as afecções deste tipo (LIPTAK, WITHROW 2007; VERSTRAETE, 2005), e aproximadamente 7% de todas as neoplasias malignas que acometem os cães (CANGUL 2001, KOENIG *et al.* 2001, LAPRIE *et al.* 2001, GOLDSCHMIDT, HENDRICK 2002, SMITH *et al.* 2002). Cocker spaniels, Poodles e raças que tenham muita pigmentação em mucosa tem maior risco de desenvolverem melanoma oral (SMITH *et al.* 2002); Scottish Terrier, Golden Retriever e Dachshund também são raças citadas (WITHROW; VAIL, 2013); porém ainda não estão estabelecidas alterações genéticas e nem correlação com pigmentação (SMITH *et al.* 2002). Animais idosos acima de 10 anos (TODOROFF, R.J, *et al.* 1979; WITHROW; VAIL, 2013) são considerados mais suscetíveis ao melanoma, embora também ocorra em animais jovens. Animais que desenvolvem melanoma oral são geralmente mais idosos do que os que desenvolvem melanoma cutâneo (MEUTEN, *et al.*, 2017). Não há predileção por sexo, e a sobrevida com tratamento é em média 18 meses (WITHROW; VAIL, 2013).

O melanoma oral e o melanoma cutâneo não são comuns em gatos, mas quando ocorrem tem a mesma agressividade e prognóstico que nos cães (SMITH *et al.* 2002; WITHROW; VAIL, 2013). Em equinos, o melanoma cutâneo ocorre ocasionalmente, porém é mais comum em animais cinzentos e idosos,

com predileção de localização no períneo, área genital e membros distais (JUBB; KENNEDY; PALMER`S, 2007).

Embora o melanoma oral não seja comum em humanos, representa apenas 1-2% de todos os melanomas, geralmente encontra-se em estadiamento avançado quando detectado e apenas 5% dos casos apresentam sobrevivência de 5 anos (POSTOW, 2012).

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva), o câncer de pele é frequente no Brasil e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, dentre esses, o melanoma representa 4% dos casos e é o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Na cavidade oral, o mais frequente é o carcinoma epidermóide, mas melanomas de mucosa também podem ocorrer. Segundo Postow, M.A., (2012), em humanos apenas 1,4% de todos os melanomas representam os melanomas em mucosa, e se desenvolvem em idade avançada com diagnóstico em média aos 70 anos, representando 0,5% de todas as neoplasias orais (SHARMA, 2012), sendo o maior local de ocorrência em palato e gengiva superior (80%) (MIHAJLOVIC, et al., 2012).

Devido à sua localização anatômica, o diagnóstico dos melanomas em mucosa é tardio e seus fatores de risco ainda não estão definidos (MIHAJJLOVIC, et al. 2012). A patogenia do melanoma está sendo associada a mutações genéticas, como por exemplo a mutação do oncogene BRAF em melanomas cutâneos humanos, o qual está presente em 75% dos melanomas deste tipo, mas não é associada aos melanomas de mucosas (CURTIN, et al. 2005). Rivera, et al., (2008) e Curtin *et al.*, (2006) relataram a superexpressão do receptor c-Kit em melanomas de mucosa orais, o c-kit é um regulador do crescimento, diferenciação e migração e proliferação dos melanócitos. Sendo assim, de acordo com Seetharamu et.al. (2010), as informações prognósticas conhecidas para o melanoma cutâneo não se aplicam necessariamente ao melanoma de mucosas. Essa afirmação é reforçada por Hernandez *et al.*,(2018) que fizeram uma revisão sobre os aspectos comparativos dos melanomas no âmbito da pesquisa básica e translacional na oncologia comparativa, e relataram que o melanoma cutâneo em humanos tem alterações genéticas relacionadas com a exposição solar, diferente dos melanomas em mucosas humanos, e dos melanomas cutâneos e orais caninos.

Microscopicamente os melanomas orais apresentam diferenças morfológicas (epitelióides, fusiformes e mistos), atividade mitótica facilmente detectável e presença de pigmento de melanina em 90% das lesões (SHARMA, 2012). Cerca de 12-25% dos melanomas são amelanicos, e por isso a imunoistoquímica é indicada para confirmar o diagnóstico, sendo possível utilizar os marcadores: S-100, vimentina, HMB-45, Melan A, PNL2 para diagnóstico diferencial, uma vez que todos os melanomas são reativos para esses anticorpos. São considerados anticorpos altamente específicos para o melanoma oral o Melan A e o PNL-2. Já o anticorpo S100 é altamente sensível (quase todos os melanomas são positivos) e pouco específico (positivo para outros tumores). Para diagnóstico em humanos é utilizado o anticorpo HMB-45, mas é pouco sensível para os cães. Nos cães, os fibrossarcomas, sarcomas histiocíticos, carcinomas de células escamosas e tumores de bainha de nervo periférico não são positivos para o Melan A, PNL-2, e por isso pode-se usar outros anticorpos para diferenciá-los. O melan A pode ser detectado em tumores produtores de hormônios esteroidais como por exemplo de adrenal, mas nenhum são diferenciais para melanomas orais. A coloração de Fontana Masson também pode ser utilizada para detectar melanina em pouca quantidade nos tecidos, mas a imunoistoquímica é mais específica e sensível (MEUTEN, 2017).

Macroscopicamente os melanomas orais apresentam consistência firme, são pigmentados ou não e podem estar associados a ulceração e sangramento. Há uma classificação de melanomas orais para humanos, subdivididas em cinco categorias: nodular pigmentado, nodular não pigmentado, macular pigmentado, pigmentado misto e não pigmentado. (TANAKA, *et al.* 1994). Segundo Teixeira (2011) seu tamanho pode variar entre 1 e 10cm de comprimento em nódulos firmes únicos ou múltiplos, os quais apresentam bordas e superfícies irregulares e assimétricas, além de possível hemorragia e ulceração.

Na medicina veterinária, de acordo com Dias, *et al.* (2013), os sinais clínicos do melanoma oral se caracterizam principalmente por aumento de volume na região oral que pode inclusive alterar o contorno facial; hemorragia, dor e desconforto no local; halitose e sialorréia intensa; disfagia, anorexia, perda de peso; comprometimento dos dentes e possíveis fraturas patológicas em mandíbula ou maxila; exoftalmia; dispneia; tosse e descarga nasal.

A classificação elaborada pela OMS (organização mundial da saúde) em 1980 indica o estadiamento do paciente com melanoma oral através da análise do TNM (tamanho do tumor primário, linfonodos regionais e metástases a distância). Entretanto, atualmente sabe-se que o tamanho do tumor não é um fator prognóstico para o melanoma, mas essa classificação continua sendo citada na prática da medicina veterinária (NISHIYA, *et al.* 2016, SPANGLER, *et al.* 2006).

Tabela 1: Classificação de tumores orais em animais domésticos. Organização mundial da saúde, Geneva, 1980.

Clinical Staging System for Oral Tumor			
Primary Tumor (T)			
	Tis	Tumor <i>in situ</i>	
	T1	Tumor <2 cm in diameter at greatest dimension	
	T1a	Without evidence of bone invasion	
	T1b	With evidence of bone invasion	
	T2	Tumor 2–4 cm in diameter at greatest dimension	
	T2a	Without evidence of bone invasion	
	T2b	With evidence of bone invasion	
	T3	Tumor >4 cm in diameter at greatest dimension	
	T3a	Without evidence of bone invasion	
	T3b	With evidence of bone invasion	
Regional Lymph Nodes (N)			
	N0	No regional lymph node metastasis	
	N1	Movable ipsilateral lymph nodes	
	N1a	No evidence of lymph node metastasis	
	N1b	Evidence of lymph node metastasis	
	N2	Movable contralateral lymph nodes	
	N2a	No evidence of lymph node metastasis	
	N2b	Evidence of lymph node metastasis	
	N3	Fixed lymph nodes	
Metastasis (M)			
	M0	No distance metastasis	
	M1	Distance metastasis	
Stage Group	Tumor (T)	Nodes (N)	Metastasis (M)
I	T1	N0, N1a, N2a	M0
II	T2	N0, N1a, N2a	M0
III	T3	N0, N1a, N2a	M0
	Any T	N1b	M0
IV	Any T	N2b, N3	M0
	Any T	Any N	M0

O melanoma oral tem pior prognóstico e comportamento mais agressivo do que os melanomas cutâneos, porque na cavidade oral há vascularização abundante e isso propicia metástases e invasão dos tecidos adjacentes (SHARMA, 2012). Segundo Gavriel, *et al.*, (2011) a presença de metástases em linfonodos no momento do diagnóstico situa-se entre 4 a 10%, e no estudo de

NAKASHIMA, 2008 esse percentual aumenta para 25%. Nos animais, sabe-se que em 40% dos casos ocorre metástase em linfonodos sem o paciente apresentar linfadenomegalia (WITHROW *et al.*, 2013), e que a aspiração de linfonodos regionais pode ser usada para detectar disseminação metastática precoce; sendo que também podem apresentar metástases em gânglios linfáticos que não são os linfonodos submandibulares (MEUTEN, 2017).

O diagnóstico do melanoma oral em cães é realizado com anamnese e exame físico; exames complementares como radiografias de crânio (fornecem informações quanto ao envolvimento ósseo), radiografias de tórax (informações sobre possíveis presença de metástases); tomografia computadorizada e a ressonância magnética (oferecer dados mais precisos e ajudam a determinar estratégias de tratamento), exames laboratoriais como hemograma, bioquímico entre outros para avaliar o estado geral do paciente. Para diagnóstico conclusivo, o melhor método é a realização do exame histopatológico de tecido tumoral coletado por biópsia (incisional ou excisional), seguido de imunoistoquímica nos casos de melanomas amelanóticos. A citologia também pode ser realizada, porém não é o melhor método (WITHROW; VAIL, 2013).

Na medicina veterinária, os possíveis tratamentos dos melanomas orais incluem excisão cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, eletroquimioterapia e imunoterapia, a indicação desses procedimentos variam em cada caso. (MEUTEN, 2017; WITHROW; VAIL, 2013).

Diversos trabalhos foram realizados a fim de explicar sobre as terapias para animais com melanomas orais. Murphy *et al.*; (2005) avaliaram dois grupos de cães portadores de melanoma oral, um grupo foi tratado apenas com radioterapia, enquanto o outro grupo com radioterapia associada a quimioterapia (carboplatina). Murphy *et al.*; (2005) concluíram que não houve diferença significativa na sobrevida dos animais tratados com o quimioterápico associado a radioterapia. Proulx *et al.* (2003) também não observaram benefícios no tratamento da quimioterapia como tratamento adjuvante em seu estudo com 27 cães, corroborando com os achados de Murphy *et al.* (2005). Contrapondo esses achados, Rassnick *et al.* (2001), obtiveram bons resultados com o uso da

carboplatina em 25 cães com melanomas orais, conseguindo 28% de taxa de resposta entre remissões completas e parciais dos tumores.

Cunha *et al.*,(2018) analisaram a sobrevida de 24 cães com melanomas orais não resseccionáveis, no qual todos foram tratados com radioterapia associada ou não, a outras terapias. Os resultados sugeriram que a radioterapia deve ser considerada como forma de tratamento, uma vez que de maneira geral, 64% dos cães apresentaram resposta parcial, 29% remissão completa e 7% doença estável, com o tempo médio de sobrevida variando entre 90-390 dias, conforme o estadio clínico do animal.

2.2. EPIGENÉTICA

Epigenética é o estudo das modificações que são herdáveis na expressão gênica e que não alteram a sequência de bases do DNA. O prefixo “epi” é derivado do grego e significa “sobreposição”, portanto a palavra remete à herança que se sobrepõe a herança genética com base no DNA (OLIVEIRA, *et al.* 2010). As alterações epigenéticas correspondem a uma série de modificações moleculares que são fundamentais para o desenvolvimento normal: diferenciação celular, embriogênese, variação fenotípica entre indivíduos geneticamente idênticos, imprinting genômico; inativação do cromossomo X; silenciamento de transposons (elementos móveis de DNA). Além disso, as alterações epigenéticas também estão sendo relacionadas ao desenvolvimento do câncer (CHAMMAS, *et al.* 2016, BARBOSA 2015; TABY, ISSA 2010).

De acordo com Feinberg, (2018) a informação epigenética também é alterada pela exposição ao ambiente, além dos mecanismos de controle já conhecidos em relação a sequência do genoma e desenvolvimento, uma visão atual da epigenética leva em consideração a influência de fatores externos.

Dentre os principais mecanismos epigenéticos descritos estão a metilação do DNA, modificações na estrutura da cromatina e ação de RNA não codificante, os quais podem ocorrer sozinhos ou em combinação (SAITO, *et al.* 2016). Entre as modificações que as histonas podem sofrer estão: metilação, fosforilação e

acetilação. Em meio a essas alterações, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais intensivamente estudado.

A metilação do DNA está relacionada à transcrição dos genes. A hipermetilação, ou simplesmente metilação, consiste na adição covalente de um radical metil (CH₃) à posição 5 do anel de citosina de um dinucleotídeo CpG. O termo CpG recebe este nome em alusão ao dinucleotídeo formado por uma base citosina (C) unida a uma base guanina (G) por meio de ligações fosfato (p), sendo que é nesta base citosina que ocorre a ligação do radical metil. Mais de 80% dos dinucleotídeos CpG se concentram em sequências repetitivas nas regiões intergênicas e intrônica (DNA satélite, long interspersed elements (LINEs) e short interspersed elements (SINEs) e transposons) (LANDER, et al., 2001). Os dinucleotídeos CpG concentram-se em localizações específicas conhecidas como ilhas CpG na região promotora do gene, e alterações nessa região promotora pode conduzir à inativação do gene (Figura 3) (SAITO, et al. 2016).

Segundo Ma, *et al.*, (2014) a metilação do DNA leva ao silenciamento transcricional do gene de duas formas. Primeiramente, de forma direta, a metilação nos sítios CpG impede o acesso dos fatores de transcrição para seus locais de ligação (JONES *et al.*, 2001). O segundo mecanismo envolve atividade do MBD (methyl CpG binding domain) (KARPF *et al.*, 2002), que contém proteínas específicas e causam repressão da transcrição de forma indireta, atuando sobre as histonas e cromatina. Proteínas MBD1, MBD2, MeCP2 podem reprimir a transcrição (NAN *et al.*, 1997; NG et al., 1999, NG *et al.*, 2000). Há um terceiro mecanismo de silenciamento que envolve função repressora de transcrição não-enzimática de proteínas do DNA metiltransferase (DNMT). Os padrões de metilação são mantidos pela pelas enzimas DNMTs, sendo que as DNMT3A e DNMT3B iniciam a metilação em sítios pouco metilados, DNMT1 preserva o padrão de metilação existente em dinucleotídeos CpG (Figura 3) (SAITO, et al. 2016). A DNMT 1, 3a e 3b têm domínios repressores da transcrição e podem recrutar HDACs (histonas deacetilases) e/ou outras proteínas co-repressoras de forma análoga as MBDs (BACHMAN *et al.*, 2001; FUKS *et al.*, 2000, 2001; ROBERTSON *et al.*, 2000; ROUNTREE *et al.*, 2000). O silenciamento do gene mediado pela metilação do DNA ocorre em muitos tipos de cânceres, principalmente em genes supressores tumorais e genes associados.

Figura 3 – Esquema representativo da metilação do DNA. Elementos para conversão de metionina: Metiltransferases (DNMT); SAM (S–adenosil metionina) é o principal doador de metil para o DNA que se converte em SAH (S–adenosil homocisteína). Adaptado Ramirez, 2008.

São observados dois padrões anormais de metilação do DNA no câncer: hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras e a hipometilação global do DNA genômico (SAITO, *et al.* 2016). De acordo com Ehrlich, (2009) esses padrões são independentes, mas podem coexistir nas neoplasias.

A hipometilação do DNA no câncer foi descrita pela primeira vez em 1983, e após, diversos estudos demonstraram a hipometilação global em diferentes tipos de cânceres humanos: carcinomas em ovário, câncer de próstata, leucemia e carcinoma hepatocelular (EHRlich, 2009). A hipometilação global pode causar instabilidade cromossômica, o que facilita mutações, recombinações gênicas ou translocações e ainda pode promover a ativação de transcrição aberrante, aumentando a expressão de oncogenes, situações que favorecem oncogênese e progressão tumoral (QURESHI, *et al.*, 2010).

A relação da hipometilação global do DNA com os estágios iniciais da oncogênese e da progressão tumoral faz com que a metilação seja considerada um biomarcador de grande importância para a clínica (EHRlich, 2009). Diferentes métodos de pesquisa podem ser utilizados para avaliar a metilação, tanto para a análise da metilação global do DNA, como formas para investigar a metilação em genes específicos.

Os níveis de metilação de DNA em leucócitos de sangue periférico estão sendo avaliados, Woo & Kim (2012) estudaram como biomarcadores para cânceres, e Wu, *et al.*, (2012) como biomarcador para carcinoma hepatocelular. O DNA é mais estável do que outros materiais biológicos e a metilação é

facilmente detectada em amostras pequenas de sangue, portanto pode ser adequada para estudos epidemiológicos em larga escala (LI, *et al.*, 2012).

A hipometilação global do DNA foi avaliada por imunistoquímica em tecidos neoplásicos (mastocitomas) de cães. Os mastocitomas com maiores graus de malignidade apresentaram hipometilação segundo no trabalho de Morimoto, *et al.* (2016). De acordo com Yamaya, *et al.*, (2015) observaram modificações epigenéticas em cães portadores de bronquite crônica que eram expostos ao cigarro, e avaliaram Montrose, *et al.*, (2015) estudaram a hipometilação global em animais expostos a poluentes ambientais.

Em humanos, Shen, *et al.* (2016) avaliaram a metilação global do DNA, através dos leucócitos de sangue periférico, em portadores de melanoma cutâneo, e os resultados sugerem que a hipometilação global está associada ao aumento do risco do melanoma, a exposição solar e a pigmentação na pele. Tellez, C.S. *et al.*, 2009 analisaram 16 linhagens celulares de melanomas e concluíram que a hipermetilação de genes específicos é frequente, está diretamente relacionada a metilação global do DNA, e independe de mutações (BRAF e NRAS). Cappetta, M. *et al.*, (2015) avaliaram a metilação global de DNA por leucócitos em melanomas e tumores de mama através do HPLC, e detectaram hipometilação global do DNA em pacientes com câncer, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Alterações epigenéticas em relação a metilação específica também estão sendo estudadas, e dentre os principais genes estudados estão o PTEN e o *NF10A*, metilados em torno de 60%(LAHTZ; STRANZENBACH; FIEDLER; *et al.*, 2010) e 80% respectivamente dos casos de melanomas cutâneos estudados em humanos (LIU; REN; HOWELL; *et al.*, 2008). Sendo assim, segundo Martinez-Cardús (2015), esses genes são bons candidatos para serem usados como biomarcadores e para a avaliação de prognóstico em melanomas cutâneos em humanos. Jin *et al.* (2015) também estudaram a metilação específica, em 27 amostras, de melanomas cutâneos e identificaram genes hipermetilados.

Na medicina veterinária, até o momento, não há relatos de pesquisas associando a metilação global de DNA de leucócitos de cães associado ao melanoma oral, o qual é o objeto de estudo do presente trabalho.

3. JUSTIFICATIVA

As doenças neoplásicas podem acometer diversos sistemas e causar grande morbidade e mortalidade tanto nos animais quanto em humanos. Os cães também desenvolvem melanoma, os quais assemelham-se estreitamente ao melanoma humano, enfatizando o papel benéfico do modelo canino pré-clínico.

Teixeira et al., 2014, relataram importantes diferenças entre melanomas melânicos e amelânicos da cavidade oral de cães. Melanomas amelânicos são encontrados na cavidade bucal de cães mais jovens, e têm comportamento mais agressivo, com taxas significativamente maiores de células tumorais em proliferação. Estes achados nos levaram a questionar se a quantidade de melanina em melanócitos neoplásicos poderia estar relacionada a alterações epigenéticas como a metilação global do DNA, e, conseqüentemente também aos índices de proliferação celular e à agressividade da neoplasia.

Este trabalho visa, portanto, comparar o padrão de metilação global do DNA em melanomas melânicos e amelânicos da cavidade bucal de cães, correlacionando-a com a quantidade de melanina dos melanócitos neoplásicos e com a proliferação celular quantificada por meio do Ki67. Como estudo adicional, procurou-se, também, avaliar a metilação global do DNA em leucócitos sanguíneos de cães portadores de melanomas melânicos e amelânicos, comparando-os com cães saudáveis não portadores de neoplasias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

O objetivo deste projeto é comparar os padrões de metilação global do DNA em melanomas orais melânicos e amelânicos de cães, correlacionando-os com a proliferação celular e a quantidade de melanina.

4.2. Objetivos específicos

- Colher amostras de casos de melanomas orais em cães oriundos de diversos Hospitais Veterinários da cidade de São Paulo (estudos retrospectivo e prospectivo)
- Realizar a marcação por imunoistoquímica da 5 metil citosina nas amostras de melanomas e avaliar os padrões de metilação global do DNA.
- Quantificar a metilação global do DNA em leucócitos sanguíneos de cães portadores de melanomas melânicos e amelânicos orais, pela técnica de HPLC (estudo prospectivo).
- Quantificar proliferação celular nas amostras de melanomas orais melânicos e amelânicos de cães por imunomarcagem do Ki67.
- Padronizar um sistema de quantificação de melanina nos melanomas melânicos orais de cães.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs) da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os certificados de aprovação encontram-se nos Anexos 1 e 2.

5.2. Amostras clínicas

População do estudo prospectivo

O grupo controle foi composto por cães saudáveis que estavam fazendo exames de rotina nas clínicas veterinárias envolvidas nesse projeto (Pet Life Cere, Vetmétodo e Provet). Os animais tinham idade entre 10 e 15 anos, sem histórico de neoplasias, leucócitos circulantes morfolologicamente normais e o número leucócitos dentro da referência (entre 6.000 e 17.000/ μ l).

Selecionou-se cães com melanoma oral para o grupo de estudos, seguindo os seguintes critérios: idade entre 10 e 16 anos, pacientes com melanoma oral sem evidências clínicas de metástases no momento em que o material foi coletado, leucócitos circulantes morfolologicamente normais, sem histórico de neoplasias e/ou outra neoplasia concomitante, sem histórico de uso de quimioterápicos antineoplásicos anteriormente. A inclusão desses animais no grupo ocorreu após a realização do exame histopatológico e quando preciso, imunoistoquímico, os quais foram separados de acordo com o fenótipo em melânico ou amelanico, de acordo com a classificação de Goldschmidt et al. (1998).

Foram obtidas amostras de sangue periférico por meio de venopunção (grupo controle e grupo de estudo), e amostras de tecido tumoral dos animais inclusos no grupo de estudo.

Para a pesquisa, foram selecionados apenas os pacientes com melanoma oral submetidos a biópsia incisional ou excisional do tumor, conforme a indicação do veterinário clínico responsável pelo caso. Uma parte da amostra do tecido colhido foi depositada em um recipiente contendo formol 10%, e encaminhada ao laboratório de histopatologia escolhido pelo veterinário clínico em cada caso. Outra parte da amostra, também armazenada em formol 10%, foi enviada ao laboratório de pesquisa para processamento do material e avaliação da metilação do DNA. A biópsia (incisional ou excisional) foi realizada com o animal sob analgesia e anestesia.

População do estudo retrospectivo

Para o estudo retrospectivo, utilizou-se amostras de tecidos de melanomas orais em cães em blocos parafinados foram obtidas dos arquivos de serviços colaboradores. O material foi reavaliado histologicamente e classificado de acordo com: Weiss; Freze (1974); Jones; Hunt; King, (2000); Jubb; Kennedy; Palmer, (2007); McGavin; Zachary, (2013). A distribuição dos casos foi estudada de acordo com a idade, raça e sexo dos animais e analisada após (marcação da 5 metil citosina e ki-67 por imunoistoquímica e concentração de melanina.

5.2.1. Amostras de sangue periférico

Amostras de sangue dos cães do grupo controle do estudo prospectivo foram coletadas por venopunção na veia jugular ou cefálica (antebraço), para realização de hemograma. Parte deste sangue foi encaminhado para laboratório de análises clínicas, e outra parte do sangue coletado (4ml) armazenado em tubo específico com EDTA e destinado ao laboratório de pesquisa para avaliação da metilação do DNA em leucócitos. Para isso, foram utilizadas seringas de 5 mL e tubos BD Vacutainer (4 mL) contendo EDTA como anticoagulante. Para a obtenção da capa leucocitária do sangue periférico, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por dez minutos e o plasma foi desprezado. Assim, a capa leucocitária foi removida do tubo com o auxílio de uma pipeta de 10 µL, e congelada à -15°C em eppendorfs de 2 mL para posterior extração de DNA.

5.2.2. Amostras dos tecidos tumorais

As amostras dos tecidos de melanoma oral, provenientes de biopsias incisionais ou excisionais de cães acometidos por esta doença, foram fixadas em formalina por 48 horas, e depois em álcool 95% para processamento histotécnico descrito a seguir.

No estudo retrospectivo, as amostras de tecido já estavam em blocos de parafina, portanto, para estes foram realizados os procedimentos de preparo das lâminas histológicas, coloração, e Imunoistoquímica, relatados a seguir.

5.3. Histotécnica

As amostras dos tecidos tumorais provenientes de biópsias estavam fixadas em formalina 10% tamponada, e foram submetidas ao seguinte processamento histotécnico: os materiais foram cortados em fragmentos menores para que fossem depositados em cassetes histológicos, e após isso foram submetidos a um protocolo de soluções de álcool etílico em concentrações crescentes para desidratação, diafanização pelo xilol e embebição em parafina (PROPHET, 1995). Por fim, os fragmentos foram inclusos em parafina líquida 63°C e devidamente identificados nos cassetes.

Preparo das lâminas histológicas para coloração e Imunoistoquímica (IHQ):

Após o tecido ser processado, emblocado em parafina, e cortado em micrótomo (5 µm de espessura), foi colocado em lâminas de vidro e silanizadas para a coloração e imunoistoquímica, respectivamente. Em seguida, as lâminas foram colocadas em estufa 65°C e submetidas a um protocolo de desparafinização (xilol), hidratação em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico, para coloração e imunoistoquímica. (ALLEN, 1995).

Após a coloração ou imunoistoquímica, para a montagem das lâminas e lamínulas foi empregada resina sintética Permount *FISHER*. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico NIKON Eclipse E800 e imagens capturadas e editadas por câmera digital acoplada a sistema computadorizado com o módulo de imagens.

5.3.1. Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

Após o preparo das lâminas descrito acima, será realizada a coloração H.E. das lâminas seguindo o protocolo descrito abaixo.

A hematoxilina, a rigor não tem caráter básico, mas comporta-se como tal, portanto é considerada um corante básico, e os componentes dos cortes que contêm muitos grupos ácidos tem afinidade por estes corantes (estruturas basófilas), como os núcleos. Já a eosina é um corante ácido, e cora estruturas basófilas, como por exemplo proteínas e fibras colágenas do tecido conjuntivo (ABRAHAMSOHN, 2011).

As lâminas depois de colocadas em estufa 65°C e submetidas ao protocolo de desparafinização (xilol), hidratação em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico, são coradas pela hematoxilina (por 4 minutos), imersas em água amoniacal 0,5% e depois lavadas em água corrente para a coloração com eosina (1 minuto), e desidratação em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico e diafanização em xilol (ALLEN, 1995).

Tabela 2: Protocolo de coloração de Hematoxilina e Eosina.

SOLUÇÃO	TEMPO
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol / Álcool	05 minutos
Álcool absoluto I	05 minutos

Álcool absoluto II	05 minutos
Álcool 95%	05 minutos
Álcool 70%	05 minutos
Água destilada	05 minutos
Hematoxilina	04 minutos
Água corrente	Rapidamente
Água amoniacal	Rapidamente
Água corrente	05 minutos
Eosina	01 minutos
Álcool 70%	05 minutos
Álcool 95%	05 minutos
Álcool absoluto II	05 minutos
Álcool absoluto I	05 minutos
Xilol / Álcool	05 minutos
Xilol II	10 minutos
Xilol I	10 minutos

5.3.2. Coloração Fontana Masson

A) Líquido de Fontana (solução impregnadora)

- nitrato de prata (10g), água destilada (100ml), amoníaco para dissolver o precipitado.

A solução impregnadora foi preparada em um becker e adicionadas gotas de amoníaco. A solução foi agitada com um bastão de vidro até que o precipitado castanho escuro se dissolvesse, ficando ligeiramente turva e sem cheiro do amoníaco. Após repousar no escuro por 24 horas para o precipitado ficar completamente no fundo do Becker, a solução foi decantada, filtrada e armazenada em um frasco escuro.

B) solução de Cajal

Hipossulfito de sódio (6,0g) e água destilada (100 ml); Sulfocianeto de amônio (6 g) e água destilada (100 ml); Cloreto de ouro amarelo (2 g) e água destilada (100 ml).

A solução de cajal foi preparada em um Becker. Adicionou-se o hipossulfito de sódio e sulfocianeto já diluídos em água destilada. Após isso, foi gotejado o cloreto de ouro diluído em 100 ml de água destilada, e a solução agitada.

Com as duas soluções prontas e armazenadas, iniciou-se o processo de sequência de impregnação:

- 1- Desparafinização, processo de alcoolizar e hidratação das lâminas
- 2- Líquido de Fontana durante 12 horas em temperatura ambiente
- 3- Lavagem com água destilada
- 4- Solução cajal sobre a lâmina durante 2 minutos
- 5- Fixação no hipossulfito de sódio 5% por 2 minutos
- 6- Lavagem em água corrente por 2 minutos
- 7- Realização da coloração de fundo
- 8- Desidratação, diafanização e montagem das lâminas.

5.3.3. Imunoistoquímica

Para isso foi aplicado o protocolo do método Polímero EnVision™+ Dual Link System-HRP. Foram utilizados os seguintes anticorpos: o anticorpo específico anti 5-metil citosina (5-mC) Abcam® que marca a metilação global, e o Ki-67 Dako® o qual marca a proliferação celular.

O índice de proliferação celular foi estabelecido pela marcação com anticorpo anti-Ki67 (Dako, Carpinteria, CA, USA), o antígeno Ki67 está presente nas células que estão nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular.

Foi utilizado também anticorpo Melan A (Dako) para diagnóstico dos melanomas amelanicos.

Os clones e as respectivas diluições dos anticorpos primários utilizados estão descritos na tabela 3.

Após a desparafinização, as lâminas foram gradualmente hidratadas em etanol, e realizado o bloqueio da peroxidase peróxido de hidrogênio por 40 minutos na estufa 37 °C. Após isso a lavagem em tampão fosfato (PBS), para então, serem submetidas a recuperação antigênica em panela de pressão Pascal – DAKO® por 15 minutos com tampão citrato pH 6,0. A seguir as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas o com anticorpo primário específico diluído em geladeira.

Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com polímero Polímero EnVision™+ Dual Link System-HRP ® por 30 minutos na estufa,

segundo as recomendações dos fabricantes. Foi feita a lavagem com PBS, depois a revelação com 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) e/ou diaminobenzidina (DAB), ambos DAKO®, e a contra coloração com hematoxilina, subsequente lavagem com água amoniacal 0,5% seguida da lavagem em água corrente, diafanização (protocolo de álcool etílico, e xilol), montagem das lâminas.

Importante ressaltar que todas as amostras foram realizadas em uma única bateria, favorecendo assim a uniformidade do tempo de exposição a e a quantificação da intensidade de coloração, e que todo o processo foi automatizado.

Tabela 3. Lista dos anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica.

Anticorpo Primário	Espécie	Clone	Diluição	Tampão
MelanA	Monoclonal (mouse)	A103	1:50	Citrato
Ki67	Monoclonal (mouse)	MIB-1	1:50	Citrato
5MeCyt	Monoclonal (mouse)	33D3	1:100	Citrato

5.4. Aquisição de imagens e contagem da marcação imunoistoquímica

Os cortes nas lâminas foram avaliados em microscópio NIKON® em campos de 100, 200 e 400 aumentos e as imagens registradas pelo sistema de aquisição de imagens Image-Pro *Plus*®.

Quantificação da marcação por imunoistoquímica

O índice de proliferação celular foi estimado com base na porcentagem de células marcadas positivamente com Ki67 num total de no mínimo 1000 células contadas manualmente em 5 a 8 campos selecionados aleatoriamente no aumento de 400x de cada lâmina, sendo que áreas de necrose e inflamação foram evitadas porque podem ter marcação positiva para ki67.

Quantificação da intensidade de marcação por imunoistoquímica

A metilação global do DNA foi quantificada nos núcleos das células neoplásicas em sistema de análise de imagens Image Pro-Plus. Para tanto, o sistema foi calibrado para reconhecer a coloração vermelha (referente a marcação com AEC), ou coloração marrom (referente a marcação com DAB), e posteriormente pelo menos 1000 núcleos de células a cada amostra serão submetidos a quantificação da intensidade da marcação. O escore de imunorreatividade de 5-mC foi obtido pela contagem manual de células marcadas e classificadas como marcação ausente, fraca, forte, totalizando a contagem mínima de 1000 células (em 5-10 campos aleatórios da lâmina).

5.5. Padronização do sistema de quantificação da melanina para classificação dos melanomas melânicos orais de cães

Em seu estudo Miot *et al.* (2012) empregaram técnicas de análise de imagem digital para quantificação histológica da melanina, Sanches *et al.* (2009) quantificaram a densidade volumétrica de colágenos em osteossarcomas. Adaptamos os protocolos dos estudos mencionados para quantificar as amostras de melanomas orais de cães. Para tanto, foi utilizado o sistema de análise de imagens Image Pro-Plus para análise da melanina tecidual e quantificação da mesma através dos pixels.

As lâminas com os cortes teciduais foram coradas por hematoxilina e eosina, e por Fontana Masson. Foram escolhidos 5 campos representativos de cada amostra, sempre evitando áreas de necrose e hemossiderina, em ambas as colorações, ou seja, cada amostra foi avaliada com hematoxilina e eosina, e com Fontana Masson. As áreas de melanina foram selecionadas através do pigmento acastanhado. As áreas sem melanina também foram quantificadas para que conseguíssemos obter o total de 100% da área, e a partir disso calcular a porcentagem da área apenas com melanina. Dessa forma, foi realizada a análise da média entre os cinco campos escolhidos de cada amostra, e após isso comparados os valores entre as amostras.

Na página inicial do programa Image Pro-Plus, após abrir o arquivo com a foto da amostra a ser avaliada, selecionar as opções “measure”, “count size”, “select color” para indicar as cores que deseja destacar na área. Após isso,

selecionar a opção “apply mask”, a qual separa a área selecionada da área restante. Com a opção “count” e “data analysis” foi obtido o valor da área de cada ponto selecionado na cor indicada anteriormente. Esses valores foram somados, para se obter a área total da cor em questão. O procedimento foi o mesmo para a área com melanina, e depois sem melanina.

5.6. Quantificação da metilação global do DNA por HPLC

A quantificação da metilação global do DNA em leucócitos de cães com melanomas orais e sadios foi realizada pelo método HPLC (*High Performance Liquide Chromatography*), que expressa como porcentagem (%) 5-metil-2'-desoxicitidina (5-metil-dC). Tal metodologia inclui a extração de DNA dos leucócitos, seguida de hidrólise enzimática do DNA e passagem da amostra pela coluna cromatográfica do sistema analítico de HPLC-DAD, com colaboração da Profa. Dra. Ana Paula Loureiro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Extração de DNA dos leucócitos

O procedimento utilizado para extração e purificação de DNA, a partir de uma alíquota da capa leucocitária obtida de 4 mL de sangue total, foi realizado seguindo o protocolo do kit de extração Gentra Puregene® (QIAGEN Sciences, Mayland, USA). Foram utilizados 600 µL de solução de lise das hemácias (*RBC Lysis Solution*, Gentra Puregene® Kit) adicionados à amostra correspondente (aproximadamente três vezes a quantidade de fração leucocitária). Após isso, as amostras foram submetidas à agitação durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 5 minutos, 2000 x g a 4°C, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado. A amostra foi agitada na solução residual remanescente junto com o precipitado até formação de uma solução homogênea. Foram adicionados 500 µL de solução de lise de células (*Cell Lysis Solution*, Gentra Puregene® Kit), e as amostras vigorosamente agitadas por 20 segundos no vortex, em seguida adicionou-se 25 µL de uma solução contendo a enzima RNAase (Ribonuclease) na concentração de 15

mg/mL. As amostras foram para a incubadora por 15 minutos a 37°C. Após a incubação é adicionado 300 µL da solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*, Gentra Puregene® Kit), e as amostras submetidas a uma vigorosa agitação e posterior centrifugação a 2000 x g por 5 min, 4°C. O sobrenadante é transferido para um tubo contendo 1 mL de isopropanol gelado, precipitando o DNA. A solução foi submetida a uma nova centrifugação por 5 min, 2000 x g, 4°C. O DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 5 min, 2000 x g, 4°C. Depois de seco, o DNA foi ressuspensão em 20 µL de uma solução de desferroxamina (0,1 mM) e transferido para um eppendorf identificado. A concentração do DNA é determinada pela leitura de absorbância a 260 nm e sua pureza pela razão de absorbância a 260/280 nm.

Hidrólise enzimática do DNA

Para a reação de hidrólise enzimática, alíquotas contendo 10 µg de DNA em desferroxamina (0,1 mM) foram adicionadas a 1 µL de tampão Tris-HCl/MgCl₂ 200 mM (pH 7,4) e 1,2 unidade de DNase 1. As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 0,0005 unidade de fosfodiesterase 1 (PDE1) e 1,2 unidade de fosfatase alcalina. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 1 hora com agitação de 1000 rpm. Ao término da segunda hora o volume final da incubação (20 µL) foi centrifugado por 10 min a 9.300 x g e o sobrenadante coletado. Alíquotas de 10 µL (5 µg de DNA) foram analisadas em um sistema de HPLC-DAD.

Sistema analítico

As alíquotas de DNA foram injetadas no sistema analítico de HPLC-DAD disponível no laboratório. A seguinte condição cromatográfica foi utilizada para as análises:

- sistema cromatográfico: coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm, ID, 5 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) com uma pré-coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex, Torrance, CA) será eluída com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH₃OH (0-25 min, 0-18% de CH₃OH; 25-27 min, 18-0% de CH₃OH; 27-37min, 0% de CH₃OH), com um fluxo de 1 mL/min, 30°C. O detector de DAD é fixado em 260 nm para a quantificação da dC e 286 nm para a

quantificação da 5-metil-dC. Curvas de calibração são feitas no intervalo de 0,05-6 nmol para dC e de 0,005-0,4 nmol para 5-metil-dC. A porcentagem da metilação global do DNA é calculada usando a seguinte equação:

$$5\text{-metil-dC}_{(\%) } = \frac{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} \times 100}{5\text{-metil-dC}_{(\text{nmol})} + \text{dC}_{(\text{nmol})}}$$

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística entre os grupos foi feita avaliação dos dados quanto a sua normalidade e variâncias para a escolha adequada do teste a ser realizado. Para distribuição normal e variâncias iguais foi aplicado o teste paramétrico ANOVA (para comparação entre 3 ou mais grupos – com pós-teste de Tukey-Kramer) ou t-Student (para comparação entre 2 grupos), e quando não paramétrico o teste de Kruskal Wallis ou U-MannWhitney. Para a correlação entre grupos, foi realizado o teste de Pearson. Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism®, sendo consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1.1. Amostragem do estudo prospectivo

O grupo experimental foi composto por 18 (100%) cães portadores de melanoma oral, sendo 9 (50%) melanomas amelânicos e 9 (50%) de melanomas melânicos. Os animais têm idade entre 10 e 16 anos; e são das seguintes raças: Sem raça definida (SRD) 66,6% (12/18), Poodle 11,1% (2/18) Yorkshire 5,5% (1/18), Beagle 5,5% (1/18), Lhasa Apso 5,5% (1/18) e Golden Retriever 5,5% (1/18).

Com relação ao gênero dos cães, foram 12 (67%) fêmeas (8 com melanomas amelânicos e 4 com melanomas melânicos) e 6 (33%) machos (1 com melanomas amelânicos e 5 com melanomas melânicos) (Figura 4).

Figura 4: Representação gráfica da avaliação da quantidade de amostras coletadas entre o grupo de fêmeas e de machos.

Quando a amostra foi incluída neste estudo já se sabia previamente o diagnóstico de cada paciente, pois já havia sido realizada a biópsia, o histopatológico e quando preciso a imunoistoquímica (com os anticorpos HMB45, Melan A e tirosinase). Mas para confirmar o diagnóstico e o fenótipo do melanoma oral de cada amostra de melanomas orais melânicos e melanomas orais amelanícos., realizou-se novamente o exame histopatológico com coloração de HE, e posterior imunoistoquímica dos melanomas amelanícos utilizando o anticorpo Melan A (Figura 5 e 6).

Figura 5: Melanoma amelanico oral de cão. Coloração H.E. (Aumento 200xs).

Figura 6: Melanoma amelanico oral de cão. Imunoistoquímica com anticorpo Melan A. (Aumento 200xs).

7.1.2. Quantificação de melanina em melanomas melânicos do estudo prospectivo

No grupo dos melanomas melânicos foi realizada a quantificação de melanina em cada amostra utilizando o programa de o sistema de análise de imagens Image Pro-Plus, e realizada a comparação entre elas. Observa-se grande diferença na concentração de melanina nas amostras de tecido dos melanomas melânicos. (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Melanoma melânico oral de cão. Coloração H.E. (Aumento 200xs)

Figura 8: Melanoma melânico oral de cão. Coloração H.E. (Aumento 200xs)

Para a avaliação da concentração de melanina em melanomas melânicos de cães foram realizadas a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) em 9 amostras e de Fontana Masson em 8 amostras.

Quando realizada a avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE, observa-se diferença significativa ($p < 0,0001$) (Figura 9; tabela 4). As amostras foram separadas em dois grupos, as que apresentavam maior e menor quantidade de melanina.

Distribuição de Melanina em Melanomas Melânicos de Cães (HE)

Figura 9: Representação gráfica da avaliação da quantidade de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães. Coloração H.E. Asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 4: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE.

Amostra	Menos Melanina	Mais Melanina
Melanomas Melânicos	2,16 $\pm$ 1,16	19,67 $\pm$ 2,86

Quando realizada a avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães pela coloração de Fontana Masson, também foi possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos com maior e menor quantidade de melanina (Figura 10; Tabela 5).

Distribuição de Melanina em Melanomas Melânicos de Cães (Fontana M)

Figura 10: Representação gráfica da avaliação da quantidade de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães. Coloração F.M. Asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 5: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de Fontana M.

Amostra	Menos Melanina	Mais Melanina
Melanomas Melânicos	5,61 $\pm$ 2,88	23,08 $\pm$ 11,77

Ao realizar a comparação entre as colorações de HE e Fontana Masson, não foi observada diferença estatística significativa ($p=0,7548$), indicando que não houve diferença entre essas colorações para a mensuração de melanina nas amostras de melanomas melânicos (Figuras 11, 12 e 13).

Distribuição entre as colorações HE x Fontana M

Figura 11 – Avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães, pela coloração de HE e de Fontana Masson. Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$).

Figura 12: Melanoma melânico oral de cão. Coloração com Fontana Masson. (Aumento 200xs)

Figura 13: Melanoma melânico oral de cão. Coloração com Hematoxilina e eosina. (Aumento 200xs)

7.1.3. Proliferação celular nas amostras do estudo prospectivo

Para avaliação índice de proliferação celular foram analisadas 9 amostras de melanomas orais amelanícos e 9 amostras de melanomas orais melânicos. Foi realizada a técnica de imunoistoquímica com o anticorpo anti-Ki67, sendo que nos melanomas orais melânicos foi utilizado o cromógeno AEC, e nos amelanícos o cromógeno DAB. As marcações obtidas pela imunoistoquímica foram classificadas em positiva e negativa (Figura 14 e Figura 15).

Figura 14: Melanoma amelaníco oral de cão. Imunoistoquímica ki67 com cromógeno DAB. (Aumento 200xs)

Figura 15: Melanoma melânico oral de cão. Imunoistoquímica ki67 com cromógeno AEC. (Aumento 200xs)

Em relação ao índice de proliferação das amostras amelanicas, observou-se diferença estatística significativa quando comparadas as células positivas e as células negativas para a marcação anti-Ki67 ($p < 0,0001$). O mesmo pôde ser observado em relação às amostras melânicas, onde a comparação entre os mesmos parâmetros também apresentou diferença significativa ($p < 0,0001$). Ao comparar os mesmos parâmetros (amelânica positiva x melânica positiva; amelânica negativa x melânica negativa; amelânica positiva x melânica negativa) entre os diferentes tipos de amostras, também foi possível observar diferenças estatística significantes ($p < 0,0001$) (Figura 16 e Tabela 6).

O índice de proliferação celular em melanomas amelanicos é maior que o de melanomas melânicos. Além disso, a quantidade encontrada de células em proliferação nos melanomas amelanicos foi maior que a quantidade encontrada de células em fase não proliferativa. No caso dos melanomas melânicos, encontraram-se mais células em fase não proliferativa do que células em fase de proliferação.

Figura 16: Representação gráfica do índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelanícos e melânicos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,0001$) e letras iguais indicam sem diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 6: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação Ki67 de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Positiva	Marcação Negativa
Amelaníco	59,40 $\pm$ 8,58	40,59 $\pm$ 8,60
Melânico	26,46 $\pm$ 5,40	73,53 $\pm$ 5,41

Assim, pode-se inferir que a proliferação celular de células de melanomas amelanícos e melânicos não é semelhante, uma vez que ocorre distinção entre as médias de células positivas e negativas para ambos os melanomas, sendo que a proliferação celular é maior nos melanomas amelanícos.

7.1.4 Quantificação da metilação global de DNA por imunoistoquímica no estudo prospectivo

Para a avaliação da metilação global de DNA foi realizada a técnica de imunoistoquímica com 5-metilcitosina em melanomas orais amelanícos e melânicos de cães, onde foram avaliadas 9 amostras de melanomas orais amelanícos e 9 amostras de melanomas orais melânicos (Figura 17 e Figura 18). As marcações obtidas foram classificadas em ausente, fraca, forte.

Figura 17: Melanoma amelanótico oral de cão. Imunoistoquímica com anti 5-metilcitosina e cromógeno AEC. (Aumento 200xs)

Figura 18: Melanoma melânico oral de cão. Imunoistoquímica com anti 5-metilcitosina e cromógeno AEC. (Aumento 200xs)

Quando realizada a avaliação da metilação de DNA através de imunoistoquímica foi possível observar diferença estatística significativa entre as marcações encontradas no melanoma amelanótico ($p < 0,0001$ para as comparações entre as marcações ausente x forte e fraca x forte; não ocorrendo diferença significativa entre as marcações ausente e fraca – $p \geq 0,05$). O mesmo padrão foi observado para o melanoma melânico ($p \geq 0,05$ para a comparação entre a marcação ausente x fraca; e $p < 0,0001$ para as comparações entre as marcações ausente x forte e fraca x forte). Além disso, não se observou diferença estatística significativa na comparação entre as marcações no melanoma amelanótico e melânico ($p \geq 0,05$). (Figura 19 e tabela 7).

Expressão da 5-metilcitosina em Melanomas Melânicos e Amelânicos

Figura 19: Representação gráfica da avaliação da metilação de DNA em melanomas amelânicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunohistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte. Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 7: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Ausente	Marcação Fraca	Marcação Forte
Amelânico	45,08 $\pm$ 11,94	50,02 $\pm$ 11,48	4,90 $\pm$ 1,95
Melânico	52,20 $\pm$ 11,22	40,12 $\pm$ 10,72	2,68 $\pm$ 1,50

Assim, pode-se inferir que a metilação do DNA de melanomas amelânicos e melânicos pela detecção por imunohistoquímica é semelhante.

7.1.5 Quantificação da metilação global do DNA por HPLC no estudo prospectivo

Para a quantificação da metilação global do DNA em leucócitos de cães com melanomas orais foi realizado o método HPLC (High Performance Liquid Chromatography), que expressou como porcentagem (%) 5-metil- 2'-desoxicitidina (5-metil-dC) em melanomas amelânicos e melânicos. Foram avaliadas 9 amostras de melanoma amelânico e 9 amostras de melanoma melânico, e 7 cães saudáveis com grupo controle.

Quando realizada a avaliação da metilação de DNA por HPLC não foi possível observar diferença estatística significativa ($p=0,3749$) entre as marcações encontradas no grupo controle, no grupo melanoma amelânico e no grupo melanoma melânico (Figura 20 e Tabela 8).

Distribuição da % de metilação global de DNA por grupo

Figura 20: Representação gráfica avaliação da metilação global de DNA de leucócitos no grupo controle, grupo de melanomas amelânicos e grupo de melanomas melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de HPCL em (%). Não ocorreu diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$) entre os grupos estudados.

Tabela 8: Médias (%) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA no grupo controle, grupo de melanomas amelanícos e grupo de melanomas melânicos de cães.

Grupo	Controle	Amelânico	Melânico
Metilação	5,03 $\pm$ 0,55	4,65 $\pm$ 0,58	5,26 $\pm$ 0,64

Assim, pode-se inferir que a metilação do DNA de melanomas amelanícos e melânicos pela detecção por HPLC é semelhante.

7.1.6. Análise da correlação de Pearson do estudo prospectivo

Para a avaliação do coeficiente de correlação (r) de Pearson entre as marcações positivas do melanoma amelaníco de cães foi feita a comparação entre a marcação por IHQ da 5 metilcitosina e do Ki67 e para a % de metilação por HPLC (Figura 21).

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a metilação por HPLC foi $r=-0,528$. Isso indica que a relação das % de 5 metilcitosina por HPLC e marcações para e para Ki67 é inversamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação diminuem proporcionalmente. Por r estar mais próximo de -1 (menos 1), a relação entre essas marcações pode ser considerada consistente, porém, ainda não se trata de uma linha perfeita para uma relação decrescente

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a metilação por IHQ foi $r=0,013$. Isso indica que a relação das marcações para 5 metilcitosina por IHQ e para Ki67 é diretamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação também aumentam proporcionalmente. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para a metilação por IHQ e a % de metilação por HPLC foi $r=-0,092$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para % de metilcitosina por HPLC é, também, inversamente proporcional. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

Correlação de Pearson em Melanomas Amelânicos

Figura 21: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva de 5 metilcitosina e por Ki67 por IHQ, e % de 5 metilcitosina por HPLC, em melanomas amelânicos de cães. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes. ($p \geq 0,05$).

Desse modo, pode-se inferir que existe uma correlação consistente entre as marcações para % de 5 metilcitosina por HPLC e Ki67 no melanoma amelânico de cães.

Para a avaliação do coeficiente de correlação (r) de Pearson entre as marcações positivas do melanoma melânico de cães foi feita a comparação entre a marcação por IHQ da 5 metilcitosina, do Ki67, a metilação por HPLC, e melanina (Figura 22).

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a metilação por IHQ foi $r=0,511$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para Ki67 é diretamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação também aumentam proporcionalmente. Por r estar mais próximo de 1 (um), a relação entre essas marcações pode ser considerada consistente, porém, ainda não se trata de uma linha perfeita para uma relação crescente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a % de metilação por HPLC foi $r=-0,119$. Isso indica que a % de 5 metilcitosina por HPLC e para a marcação por Ki67 é inversamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra diminuem proporcionalmente. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre esses fatores pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e para a melanina foi $r=-0,202$. Isso indica que a relação das marcações para Ki67 e para melanina é, também, inversamente proporcional. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para a metilação por IHQ e a % de metilação por HPLC foi $r=-0,083$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para % de 5 metilcitosina por HPLC é, também, inversamente proporcional. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre esses fatores pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para a metilação por IHQ e a melanina foi $r=0,374$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para metilcitosina por HPLC é diretamente proporcional. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente.

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para a metilação por HPLC e para a melanina foi $r=-0,280$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHC e para % de 5 metilcitosina por HPLC é inversamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação diminuem proporcionalmente. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre esses fatores pode ser considerada aleatória ou quase inexistente (Figuras 23).

Correlação de Pearson em Melanomas Melânicos

Figura 22: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina e Ki67 por IHQ, % de 5metilcitosina por HPLC, e % de melanina em melanomas melânicos de cães. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p \geq 0,05$) entre as correlações.

Desse modo, pode-se inferir que não existe uma correlação consistente entre as marcações para metilcitosina, Ki67 e melanina no melanoma melânico de cães.

7.2. Estudo retrospectivo

Foram selecionados 20 (100%) casos de melanomas oral em cães dos arquivos do laboratório de farmacologia aplicada e toxicologia – no departamento de patologia da USP - sendo que 10 (50%) foram classificados como melânicos e 10 (50%) amelânicos. O grupo foi composto por 12 (60%) machos e 8(40%) fêmeas, todos entre 10 e 16 anos. As raças dos cães eram: Sem raça definida 35% (7), dachshund 15% (3), golden retriever 10% (2), schnauzer 10% (2), poodle 10% (2), Yorkshire 5% (1), pinscher 5% (1), cocker 5% (1), pug 5% (1).

7.2.1. Avaliação da concentração de melanina em melanomas melânicos em cães no estudo retrospectivo

Quando realizada a avaliação retrospectiva de 10 amostras para concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE, foi possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os grupos com maior e menor quantidade de melanina (Figura 23; tabela 9).

Distribuição de Melanina em Melanomas Melânicos de Cães (HE)

Figura 23: Representação gráfica da avaliação da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de amostras de cães, pela coloração de HE. Asterisco (*) indica diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 9: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da concentração de melanina presente em melanomas melânicos de cães, pela coloração de HE.

Amostra	Menos Melanina	Mais Melanina
Melanomas Melânicos	2,15 $\pm$ 1,67	25,94 $\pm$ 17,33

7.2.2. Avaliação do índice de proliferação celular em melanoma oral de cães do estudo retrospectivo

Para a avaliação do índice de proliferação celular foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) com Ki67 em melanomas melânicos e amelânicos de cães, onde foram avaliadas 10 amostras amelânicas e 10 amostras melânicas. As marcações obtidas pela imunoistoquímica foram classificadas em positiva e negativa.

Em relação ao índice de proliferação das amostras amelânicas, não se observou diferença estatística significativa quando comparadas as células positivas e as células negativas para a marcação com Ki67 ($p \geq 0,05$). No entanto, pôde ser observada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação às amostras melânicas, na comparação entre os mesmos parâmetros. Ao comparar os mesmos parâmetros (amelânica positiva x melânica positiva; amelânica negativa x melânica negativa; amelânica positiva x melânica negativa) entre os diferentes tipos de amostras, também foi possível observar diferenças estatística significantes ($p < 0,0001$) (Figuras 24; Tabela 10).

O índice de proliferação celular em melanomas amelânicos é maior que o de melanomas melânicos. A quantidade encontrada de células em proliferação nos melanomas amelânicos foi maior que a quantidade encontrada de células em fase não proliferativa. No entanto, nos melanomas melânicos, encontraram-se mais células em fase não proliferativa do que células em fase de proliferação.

Figura 24: Representação gráfica do Índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelânicos e melânicos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,0001$) e letras iguais indicam sem diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 10: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação com Ki67 de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Positiva	Marcação Negativa
Amelânico	55,69 $\pm$ 11,92	44,31 $\pm$ 11,92
Melânico	16,60 $\pm$ 7,89	83,40 $\pm$ 7,89

Assim, pode-se inferir que o índice proliferação celular medido pela contagem de células positivas para Ki67 em melanomas amelânicos e melânicos não é semelhante, uma vez que ocorre distinção entre as médias de células positivas e negativas para ambos os melanomas, sendo que a proliferação celular é significativamente maior nos melanomas amelânicos.

7.2.3. Avaliação da metilação global de DNA por meio de imunoistoquímica em melanoma oral amelanico e melânico em cães do estudo retrospectivo

Para a avaliação da metilação global de DNA foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) com 5-metilcitosina em melanomas amelanicos e melânicos de cães, onde foram avaliadas 10 amostras de cada tipo de melanoma. As marcações obtidas pela imunoistoquímica foram classificadas em ausente, fraca e forte.

Quando realizada a avaliação da metilação de DNA através de imunoistoquímica foi possível observar diferença estatística significativa entre as marcações encontradas no melanoma amelanico ($p < 0,0001$ para as comparações entre as marcações ausente x fraco, ausente x forte e fraca x forte). O mesmo padrão foi observado para o melanoma melânico ($p < 0,0001$ para as comparações entre as marcações ausente x fraco, ausente x forte e fraca x forte).

Além disso, observou-se diferença estatística significativa na comparação entre as marcações no melanoma amelanico e melânico, na comparação entre as marcações amelanico ausente x melânico forte, entre amelanico fraco x melânico ausente, entre amelanico fraco x melânico fraco e entre amelanico fraco x melânico forte ($p < 0,0001$). Porém, na comparação entre amelanico forte x melânico forte não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) significativa (Figura 26; Tabela 11).

Expressão da 5-metilcitosina em Melanomas Melânicos e Amelânicos

Figura 25: Representação gráfica da avaliação da metilação de DNA em melanomas amelânicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunoistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte. Letras iguais indicam sem diferenças estatísticas significantes ($p \geq 0,05$) e letras diferentes indicam com diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 11: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Ausente	Marcação Fraca	Marcação Forte
Amelânico	31,36 $\pm$ 9,81	67,57 $\pm$ 9,48	1,07 $\pm$ 0,69
Melânico	54,83 $\pm$ 6,01	44,25 $\pm$ 5,98	0,93 $\pm$ 0,36

Assim, pode-se inferir que a metilação do DNA de melanomas amelânicos e melânicos pela detecção por imunoistoquímica não foi semelhante.

7.3. Análise com todas as amostras (dos estudos retrospectivo e prospectivo)

As amostras do prospectivo e as amostras do estudo retrospectivo foram reunidas em um único grupo para análise de metilação global do DNA por imunohistoquímica e proliferação celular.

7.3.1 Comparação da avaliação da metilação global de DNA por meio de imunohistoquímica com 5-metilcitosina em melanomas amelanícos e melânicos em cães, nas amostras do estudo retrospectivo e prospectivo.

Para a avaliação da metilação global de DNA foi realizada a técnica de imunohistoquímica (IHQ) anti-5-metilcitosina em melanomas amelanícos e melânicos de cães, onde foram avaliadas 19 amostras de cada tipo de melanoma. As marcações obtidas pela imunohistoquímica foram classificadas em ausente, fraca e forte.

Quando realizada a avaliação da metilação de DNA através de imunohistoquímica foi possível observar diferença estatística significativa entre as marcações encontradas no melanoma amelaníco ($p < 0,0001$ para a comparação entre as marcações ausente x forte; as demais comparações não foram significantes – $p \geq 0,05$). O mesmo padrão foi observado para o melanoma melânico ($p < 0,0001$ para a comparação entre as marcações ausente x forte e fraca x forte). Além disso, observou-se diferença estatística significativa na comparação entre as marcações no melanoma amelaníco e melânico, na comparação entre as marcações amelaníco ausente x melânico forte, entre amelaníco fraco x melânico forte, entre amelaníco forte x melânico ausente e entre amelanícos forte x melânico fraco ($p < 0,0001$) (Figuras 26; Tabela 9).

Expressão da 5-metilcitosina em Melanomas Melânicos e Amelânicos

Figura 26: Representação gráfica da avaliação da metilação de DNA em melanomas amelânicos e melânicos de cães. Marcações apresentadas através da avaliação de imunoistoquímica, sendo consideradas ausente, fraca e forte. Asteriscos (*) indicam diferença estatística significativa ($p < 0,0001$).

Tabela 12: Médias (em %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da metilação do DNA de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Ausente	Marcação Fraca	Marcação Forte
Amelânico	39,02 $\pm$ 18,41	58,15 $\pm$ 18,76	2,83 $\pm$ 2,37
Melânico	57,65 $\pm$ 16,61	40,64 $\pm$ 16,41	1,71 $\pm$ 1,57

Assim, pode-se inferir que o padrão de metilação do DNA de melanomas amelânicos e melânicos pela detecção por imunoistoquímica não foi semelhante.

7.3.2. Comparação da avaliação da proliferação celular por meio de imunoistoquímica com ki67 em melanomas amelanicos e melânicos em cães, nas amostras do estudo retrospectivo e prospectivo.

Para a avaliação do índice de proliferação celular foi realizada a técnica de imunoistoquímica (IHQ) anti-Ki67 em melanomas melânicos e amelanicos de cães, onde foram avaliadas 19 amostras amelanicas e 19 amostras melânicas. As marcações obtidas pela imunoistoquímica foram classificadas em positiva e negativa.

Em relação ao índice de proliferação das amostras amelanicas, não se observou diferença estatística significativa quando comparadas as células positivas e as células negativas para a marcação com Ki67 ($p \geq 0,05$). No entanto, foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação às amostras melânicas, na comparação entre os mesmos parâmetros. Ao comparar os mesmos parâmetros (amelânica positiva x melânica positiva; amelanica negativa x melânica negativa; amelanica positiva x melânica negativa) entre os diferentes tipos de amostras, também foi possível observar diferenças estatística significantes ($p < 0,0001$) (Figuras 27; Tabela 10).

O índice de proliferação celular em melanomas amelanicos é maior que o de melanomas melânicos. Além disso, a quantidade encontrada de células em proliferação nos melanomas amelanicos foi maior que a quantidade encontrada de células em fase não proliferativa. No entanto, no caso dos melanomas melânicos, encontraram-se mais células em fase não proliferativa do que células em fase de proliferação.

Figura 27: Representação gráfica do Índice de proliferação celular (células positivas e negativas) para marcação com anticorpo anti-Ki67 em amostras de melanomas amelanóticos e melânicos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0,0001$) e letras iguais indicam sem diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 13: Médias (em porcentagem %) $\pm$ desvio padrão das avaliações da marcação anti-Ki67 de melanomas de cães.

Melanoma	Marcação Positiva	Marcação Negativa
Amelânico	57,32 $\pm$ 12,04	42,68 $\pm$ 12,04
Melânico	21,12 $\pm$ 9,03	78,88 $\pm$ 9,03

Assim, pode-se inferir que a proliferação celular de células de melanomas amelanóticos e melânicos não é semelhante, uma vez que ocorre distinção entre as médias de células positivas e negativas para ambos os melanomas, sendo que a proliferação celular é maior nos melanomas amelanóticos.

7.3.3. Análise da correlação de Pearson com as amostras do estudo retrospectivo e prospectivo

Para a avaliação do coeficiente de correlação (r) de Pearson entre as marcações positivas do melanoma amelanico de cães foi feita a comparação entre a marcação para metilcitosina por IHQ e para a marcação para o Ki67 (Figura 28).

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a metilação por IHQ foi $r=0,171$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para Ki67 é diretamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação também aumentam proporcionalmente. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente. (Figuras 28).

Correlação de Pearson em Melanomas Amelânicos

Figura 28: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina por IHQ e por Ki67 em melanomas amelanicos de cães. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p \geq 0,05$).

Desse modo, pode-se inferir que não existe uma correlação consistente entre as marcações para metilcitosina por IHQ e Ki67 no melanoma amelanico de cães.

Para a avaliação do coeficiente de correlação (r) de Pearson entre as marcações positivas do melanoma melânico de cães foi feita a comparação entre a marcação para metilcitosina por IHQ, para a marcação para o Ki67 e para a melanina (Figura 29).

O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e a metilação por IHQ foi $r=0,526$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para Ki67 é diretamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação também aumentam proporcionalmente. Por r estar mais próximo de 1 (um), a relação entre essas marcações pode ser considerada consistente, porém, ainda não se trata de uma linha perfeita para uma relação crescente. O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para Ki67 e para a melanina foi $r=0,416$. Isso indica que a relação das marcações para Ki67 e para melanina é, também, diretamente proporcional. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente. O coeficiente de correlação de Pearson entre a marcação positiva para a metilação por IHQ e a melanina foi $r=0,203$. Isso indica que a relação das marcações para metilcitosina por IHQ e para melanina é diretamente proporcional, isto é, quando as médias encontradas em uma marcação aumentam, as médias encontradas na outra marcação também aumentam proporcionalmente. No entanto, por r estar mais próximo de 0 (zero), a relação entre essas marcações pode ser considerada aleatória ou quase inexistente (Figuras 29).

Correlação de Pearson em Melanomas Melânicos

Figura 29: Representação gráfica da correlação de Pearson para células com marcação positiva para marcação de metilcitosina por IHQ, Ki67 e melanina em melanomas melânicos de cães. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes ($p \geq 0,05$) entre as correlações, apenas entre a marcação por IHQ e por Ki67 ($p=0,021$).

Desse modo, pode-se inferir que não existe uma correlação consistente entre as marcações para metilcitosina, Ki67 e melanina no melanoma melânico de cães.

8. DISCUSSÃO

Este estudo foi idealizado com a finalidade de comparar melanomas melânicos e amelânicos da cavidade oral de cães quanto a padrões de metilação global do DNA, proliferação celular, e quantidade de melanina que podem indicar maior agressividade tumoral.

Diversos parâmetros histopatológicos são estudados para avaliar a prognóstico dos melanomas orais em cães, dentre eles a morfologia, atipias nucleares, mitoses, pleomorfismo celular, avaliação de margens, grau de pigmentação, proliferação celular. No presente trabalho, o grau de pigmentação dos tumores e o índice de proliferação celular foram avaliados, bem como a metilação global do DNA, a fim de obter novos dados quanto ao prognóstico. Clinicamente observa-se que os animais com melanomas amelânicos tem pior evolução da doença, quando comparados aos melanomas melânicos.

Dois estudos independentes foram realizados, um estudo prospectivo, no qual também foi analisada a metilação global do DNA de leucócitos sanguíneos, e outro retrospectivo, nos quais se analisou a metilação global do DNA e os índices de proliferação celular por imunoistoquímica, e a quantificação da melanina nos melanomas melânicos. Esses estudos foram primeiramente avaliados de forma individual, e após isso, as amostras foram analisadas em um grupo único (amostras do prospectivo e do retrospectivo).

Na pesquisa prospectiva 18 amostras de cães com melanoma oral foram estudadas, e dentre esses animais as fêmeas representaram 67% (12/18) do total amostral e os machos 33% (2/18). Já no estudo retrospectivo, que foram selecionadas 20 amostras, esta proporção foi inversa com predomínio dos machos (12/20); fêmeas (8/20). A avaliação de maior frequência das fêmeas que desenvolveram melanoma oral corrobora com dados publicados por Ramos-Vara (2000) onde as fêmeas caracterizaram a maior parte do grupo de cães

estudado (55%), e por Mukaratirwa, *et al.* (2005) onde 70% dos animais que desenvolveram melanoma (incluindo melanomas cutâneo, oral e ocular) eram fêmeas. Entretanto, pesquisas apresentadas por Vos, Gaag (1987); Todorff, Brodey (1979) e Simons (2015) os cães machos foram mais acometidos. Em literatura recente, Miller (2013), Withrow (2013) e Meuten (2016) relatam não haver predileção por sexo.

A idade de todos os animais selecionados nos grupos foi entre 10 e 16 anos, e justamente por estar amplamente estabelecida maior frequência de melanoma oral em idosos do que em jovens (TODOROFF, R.J, *et al.* 1979; WITHROW; VAIL, 2013, MILLER *et. al.*, 2013). Quanto a raça, estavam inseridos no grupo do estudo prospectivo: SRD 66,6% (12/18), Poodle 11,1% (2/20) Yorkshire 5,5%(1/20), Beagle 5,5%(1/20) e Lhasa Apso 5,5%(1/20). No estudo retrospectivo (20) foram registrados SRD 35% (7/20), Dachshund 15% (3/20), Poodle 10% (2/20), Golden 10% (2/20), Schnauzer 10% (2/20), Pinscher 5% (1/20), Cocker Spaniel 5%(1/20), Pug 5%(1/20), Yorkshire 5%(1/20). Devido ao número de amostras ser baixo, e existir uma grande variação de raças entre os cães, não foi possível discutir com detalhes este tópico, porém pesquisas indicam que entre as principais raças acometidas estão: Cocker spaniels, Poodles (SMITH *et al.* 2002), Scottish Terrier, e Dachshund (WITHROW; VAIL, 2013), Schnauzer, Golden Retriever (WITHROW; VAIL, 2013; GILLARD *et. al.*, 2014).

A sobrevida dos animais participantes desta pesquisa foi acompanhada. Entretanto cada paciente foi submetido a diferentes formas de tratamentos, de acordo com a indicação do veterinário clínico responsável e da aceitação dos seus tutores, e por este motivo, a sobrevida não foi considerada na análise estatística. De acordo com Withrow, Vail (2013) a sobrevida de animais com melanoma oral submetidos aos tratamentos é em média 18 meses. Há variação do prognóstico e da taxa de sobrevida dependendo das características intrínsecas do tumor e estadiamento da doença.

Para a análise do grau de pigmentação no presente estudo, foi padronizado um sistema quantitativo para verificar a porcentagem de concentração da melanina nos melanomas melânicos dos cães. Os melanomas amelanicos não foram avaliados porque não possuem pigmentação. De acordo com Smedley, *et al.* (2011) até o momento as pesquisas avaliaram a

porcentagem de células com melanina ou classificaram subjetivamente a quantidade de pigmentação por observação, mas não identificam limiares que possam ser avaliados estatisticamente. Sendo assim, neste trabalho foi padronizado um sistema de quantificação da concentração de melanina utilizando duas técnicas de colorações (H.E. e Fontana M.) no estudo prospectivo. No estudo retrospectivo a análise foi realizada com a mesma técnica, mas como as colorações se mostraram semelhantes quando foram comparadas estatisticamente, optou-se por utilizar apenas p H.E. nessa fase do estudo. Observou-se diferenças na concentração de melanina entre as amostras e obteve-se diferenças estatísticas significativa com as ambas colorações e em ambos os grupos estudados. Porém, através da correlação de Pearson, não podemos afirmar que a quantidade de melanina tem relação com a proliferação celular e com a metilação global do DNA. Da mesma forma, pesquisas realizadas por Schultheiss, *et al.* (2006) e Mukaratirwa, *et al.* (2005) em melanomas orais, cutâneos, em dígitos e oculares não encontraram correlação entre quantidade de melanina com a sobrevida. Entretanto, Bergin, *et al.* (2011) classificaram em três categorias (ausente, baixo/moderado, alto) a quantidade porcentagem de células pigmentadas em melanomas orais caninos e constataram que pelo menos 50% dos animais com alto grau de pigmentação tiveram maior taxa de sobrevida quando comparados com melanomas amelanicos ou com baixa pigmentação.

Através da técnica de imunoistoquímica foi avaliada a proliferação celular utilizando o anticorpo ki67 e a metilação global do DNA, com o anticorpo 5-metilcitosina. Na presente pesquisa, nos dois grupos estudados, tanto prospectivo quanto no retrospectivo, a porcentagem da proliferação celular em melanomas amelanicos foi maior do que nos melanomas melanicos, com estatísticas significativas. Quando realizada a junção dessas amostras (prospectivo e retrospectivo) em um único grupo, o resultado se mantém estatisticamente significativamente, e os melanomas amelanicos tem maior proliferação celular quando comparados com os melanicos. Bergin, *et al.* (2011) avaliou a proliferação celular com índice ki67 em melanomas orais de cães e relacionou ao prognóstico dos animais, e os dados dessa pesquisa demonstraram que o índice médio de Ki67 para animais que morreram do

melanoma em um ano após o diagnóstico (40,8) é significativamente maior do que o grupo do que os cães que sobreviveram após um ano do diagnóstico (11,2). Smedley, (2010) recomenda que o índice Ki67 seja usado como fator determinante para a previsão do prognóstico, desde que as características histológicas e clínicas sejam levadas em consideração individualmente em cada caso. De acordo com Sevastre et al. (2012) a avaliação da proliferação celular, realizada com ki67 em 22 amostras de melanomas em cães, não foi correlacionado com o tipo de célula predominante, índice mitótico, linfócitos infiltrados ou extensão de necrose, mas índice mitótico e a necrose mostraram correlação positiva significativa. Teixeira et al.; (2014) também verificou que os melanomas amelanicos apresentam maior número de mitoses e maior índice de proliferação celular. Portanto, pode-se sugerir que, quando consideramos a proliferação celular, melanomas orais amelanicos tem pior prognóstico que os melanicos nos cães.

Quanto a metilação global do DNA analisada por imunoistoquímica, as marcações foram classificadas em ausentes, fracas e fortes. No estudo prospectivo não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre a porcentagem de marcações dos melanomas amelanicos e melanicos. Entretanto, no estudo retrospectivo as marcações fracas dos melanomas amelanicos foram maiores do que nos melanomas amelanicos, e ocorreu diferença estatística significativa, o que indica hipometilação nos melanomas amelanicos. Quando reunimos as amostras do estudo retrospectivo e prospectivo em único grupo, as marcações fracas dos melanomas amelanicos continuaram maiores do que nos melanomas amelanicos, reforçando o resultado do estudo retrospectivo. Corroborando com esses achados, diversos trabalhos inferem hipometilação global do DNA em câncer: Morimoto et al. (2016) avaliaram a metilação global do DNA em mastocitomas caninos por imunoistoquímica e demonstraram que tumores mais agressivos eram hipometilados. Esses dados corroboram com os resultados da pesquisa de Hernandez-Blazquez, et al., (2000), que investigaram em humanos a metilação global do DNA no câncer de cólon, também se obteve menores níveis de metilação nas neoplasias mais agressivas. Epiphany, (2017) estudou a metilação global do DNA de linfomas caninos em emblocados celulares de

leucócitos e os escores de imunorreatividade de 5MeCyt do grupo com linfoma apresentaram níveis mais baixos quando comparado com o grupo controle. Batschinski, (2017) estudaram a metilação global do DNA em hemangiossarcomas esplênicos e dérmicos de cães por imunoistoquímica, classificando as marcações em forte, fraca e negativa, e concluíram que a maior parte dos hemangiossarcomas apresentaram hipometilação global ou um padrão negativo para a marcação.

No estudo prospectivo, a metilação global do DNA também foi avaliada pela técnica de HPLC, considerada o método “ouro”, e verificou-se que a metilação global do DNA de melanomas amelanicos, melanomas melânicos e grupo controle são semelhantes, e não houve diferença estatística significativa. Entretanto, observa-se uma discreta tendência a hipometilação dos melanomas amelanicos, e com um maior número de amostras talvez isso fosse comprovado. De acordo com Esteller (2008), a hipometilação global do DNA é comum em muitos tecidos neoplásicos humanos e em células precursoras do câncer; segundo o estudo de Epiphanyo, (2017) cães com linfoma possuem metilação global de DNA de leucócitos reduzida quando comparado com cães saudáveis pela técnica HPLC, Friso et al. (2013) também demonstraram hipometilação global do DNA de leucócitos de pessoas com diferentes tipos de câncer pelo método de cromatografia líquida/espectrometria de massas.

Quando comparamos os resultados entre a metilação global realizada por imunoistoquímica e pela técnica de HPLC (que é considerado o método ouro), observa-se que os resultados são correspondentes. Isso sugere que a imunoistoquímica para avaliação da metilação global em melanomas orais é um método eficaz, e confirma os achados pelo HPLC que é o padrão ouro.

Quando comparamos a % de metilcitosina por HPLC e a marcação do Ki67 no melanoma amelanico de cães do estudo prospectivo, pode-se inferir que existe uma correlação consistente e inversamente proporcional entre as marcações para Ki67 onde quanto maior a proliferação celular, menor a metilação.

9. CONCLUSÕES

Com os dados estatísticos, podemos afirmar que os melanomas amelanicos tem maior porcentagem de proliferação celular quando comparados aos melanomas melânicos, mas esse fator não demonstra estar correlacionado a metilação global do DNA e com a quantidade de melanina dos melanomas melânicos.

A quantidade de melanina foi avaliada por duas técnicas de colorações diferentes, e obtivemos resultados semelhantes em ambas, o que reforça a eficácia do método.

Quanto a avaliação da metilação global do DNA pela técnica de HPLC, não se obteve diferença significativa entre os grupos, porém os melanomas amelanicos tem discreta tendência a hipometilação.

Existe uma correlação consistente e inversamente proporcional entre as marcações para e Ki67 nos melanomas amelanicos: quanto maior a proliferação celular, menor a metilação por meio da técnica de HPLC.

Quanto a avaliação da metilação global do DNA pela técnica de imunoistoquímica, os melanomas melânicos apresentam maior porcentagem de marcação fraca quando comparados com os melânicos, e isso indica menor metilação global dos melanomas amelanicos quando comparados com os melânicos.

10. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P.A. Colorações para microscopia de luz. Hematoxilina e eosina. **MOL Microscopia OnLine**, 2011. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/mol/1basico33a.html>> Acesso em 20.out.2015

ALLEN, T.C. Hematoxilina y eosina. In: PROPHET, E.B. et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patologia de los Estados Unidos de América, 1995. p.55-60.

BACHMAN, K.E.; ROUNTREE, M.R.; BAYLIN, S.B. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n.34 p.32282-32287, ago.2001.

BATSCHINSKI, K. Avaliação da eficácia da 5-Azacitidina e SAHA nas linhagens de hemangiossarcoma canino. Tese de doutorado. USP. 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-27032018-132505/pt-br.php>> Acesso em abr.2018.

BERGIN, I. L; SMEDLEY, R. C.; ESPLIN, D. G.; SPANGLER, W. L.; KIUPEL, M. Prognostic Evaluation of Ki67 Threshold Value in Canine Oral Melanoma. **Vet Pathol.** v.48, n.1, p. 41-53, 2011.

BERGMAN, P. J. Canine Oral Melanoma. **Topics in Companion Animal Medicine.** V. 22, n.2, P. 55–60, 2007

CAMARGO, L.P. Neoplasias melanocitias em cães: aspectos clinicos e histopatológicos em 58 casos. 2005. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/5019/texto%20completo.pdf?sequence=1>> Acesso em 22.abr.2016

CANGUL, I.T. Improved classification, diagnosis and prognosis of canine round cell tumours. **Vet. Sci. Tomorrow**, v. 4, p.1-19, 2001.

CAPPETTA, M.; BERDASCO, M.; HOCHMANN,J.; BONILLA, C.; SANS,M.;HIDALGO, P.C.; ARTAGAVEYTIA,N.; KITTLES,R.; MARTÍNEZ, M.; ESTELLER, M.; BERTONI,M. Effect of genetic ancestry on leukocyte global DNA methylation in cancer patients. **BMC Cancer**, n. 15, v. 434, mai.2015.

CHENIER, S.; DORE, M. Oral malignant melanoma with osteoid formation in a dog. **Vet. Pathol.**, v.36, n.74-76, 1999.

COSTA, N.F.; Borges,M.R.M.M.;FERNANDES,R.C. Study of the histopathological types of cutaneous melanoma in Palmas-TO from 2001 to 2011. **An Bras Dermatol.**v.90, n.5, p.638-45, 2015.

CUNHA, S.C.S.; CORGOZINHO, K.B.; SILVA F.B.F; SILVA, K.V.G.C.; FERREIRA, A.M.R. Radiation therapy for oral melanoma in dogs: A retrospective study. **Cienc. Rural** v.48, n.4, p. 1-10 ,2018.

CURTIN, J.A.; FRIDLYAND, J.; KAGESHITA, T. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med.** V.353:p. 2135-2147 .2005

CURTIN, J. A; BUSAM, K.; PINKEL, D.; Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. **J Clin Oncol.** V. 24, p. 4340-4346, 2006

DIAS, F. G. G.; DIAS, L. G. G. G.; PEREIRA, L. F.; CABRINI, T. M. Neoplasias orais nos animais de companhia. Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. Ano XI – N. 20, Jan. 2013. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ncCoalIH79a8X7H_2013-6-21-16-12-48.pdf> Acesso em mar.2018.

EPIPHANIO, T.M.F. Estudo da metilação global do DNA no sangue periférico de cães sadios e cães com câncer. **Dissertação de mestrado**. USP, 2017 Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-27032018-131848/pt-br.php>. Acesso em abr.2018.

EHRlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. **Epigenomics**. V.1, N.2, P. 239-259, dez.2009.

Esteller, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, 2008.

FEINBERG, A. P. The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. **N Engl J Med**. V. 378 p.1323-34. 2018

FERNANDES, C.C.; MEDEIROS, A.A.; MAGALHÃES,G.M.; SZABÓ,M.P.J.; QUEIROZ,R.P.; SILVA,M.V.A.; SOARES,N;P. Frequência de neoplasias cutâneas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal deUberlândia durante os anos 2000 a 2010. **Biosci. J.**, v. 31, n. 2, p. 541-548, apr. 2015.

FRISO, S.; UDALI, S.; GUARINI, P. *ET AL*. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 3, p. 348-55, 2013.

FUKS F, BURGERS WA, BREHM A, HUGHES-DAVIES L, KOUZARIDES T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. **Nature Genetics.**, v.24, n.1, p. 88-91, jan. 2000.

FUKS, F.; BURGERS, W.A.; GODIN, N.; KASAI, M.; KOUZARIDES, T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. **The EMBO Journal**, v.20, n.10, p. 2536-2544, mai.2001.

FULLER, B. Proceso de Pigmentación. **Nu Skin**. 2004. Disponível em: <<https://issuu.com/somosnuskin/docs/tri-phasic-white-presentacion-espanol/7>> Acesso em 01.abr.2018.

GILLARD, M.; CADIEU, E.; DE BRITO, C.; ABADIE, J.; VERGIER, B.; DEVAUCHELLE, P.; DEGORCE, F.; DRÉANO, S.; PRIMOT, A.; DORSO, L.; LAGADIC, M.; GALIBERT, F.; HÉDAN, B.; GALIBERT, M.D.; ANDRÉ, C. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v.27, n.1 p.90–102, Jan.2014.

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

GOLDSCHMIDT, M.H.; HENDRICK, M.J. Tumors of the skin and soft tissues, p.45-118. In: Meuten D.J. (Ed.), **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Ames: Iowa State Press, 2002.

GAVRIEL, H.; MCARTHUR, G.; SIZELAND, A.; HENDERSON M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. **Melanoma Res**. V.21, N.4, p.257-66, ago.2011

HERNANDEZ, B.; ADISSU, H.A.; WEI, B.R.; MICHAEL, H.T.; MERLINO, G.; SIMPSON, R.M. Naturally Occurring Canine Melanoma as a Predictive Comparative Oncology Model for Human Mucosal and Other Triple Wild-Type Melanomas. **Int J Mol Sci**. V.19; N.2. P.394. 2018

HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F.J.; HABIB, M.; DUMOLLARD, J-M.; BARTHELEMY, C.; BENCHAI, M.; CAPOA, A.; NIVELEAU, A. Evaluation of global DNA hypomethylation in human colon cancer tissues by immunohistochemistry and image analysis. **Gut**, v. 47, p. 689–693, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (Org.). **Tipos de Câncer – boca - Regiões anatômicas e prognósticos**. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/regioes_anatomicas_e_prognosticos>. Acesso em: 13 abr. 2016

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (Org.). **Tipos de Câncer – pele melanoma**. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em:

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao>. Acesso em: 13 abr. 2016

JIN, S.; WU, X.; YANG, L.; PFEIFER, G.P. The DNA methylation landscape of human melanoma. **Genomics**. v. 106, p. 322–330, 2015.

JONES, P.A., TAKAI, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. **Science**, V. 293, n. 5532, p. 1068-1070, ago. 2001.

JONES, P.L.; VEENSTRA, G.J.; WADE, P.A.; VERMAAK, D.; KASS, S.U.; LANDSBERGER, N.; STROUBOULIS, J.; WOLFFE, A.P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nature Genetics**, v.19, n.2, p.187-191 jun.1998

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**, 6ª. Ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.G. (Eds.) **Pathology of Domestic Animals**. 5.ed. v.1. Elsevier Saunders, 2007. 899p.

KARPF, A.R.; JONES, D.A. Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. **Oncogene**, v. 21 p. 5496-5503, 2002.

KOENIG, A.; WOJCIESZYN, J.; WEEKS, B.R.; MODIANO, J.F. Expression of S100, vimentin, NSE, and melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. **Vet. Pathol**. V.38, p.427-435, 2001.

LAHTZ, C.; STRANZENBACH, R.; FIEDLER, E.; HELMBOLD, P.; DAMMANN, R.H. Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. **J Invest Dermatol**. V.130, p.620- 622; 2010.

LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature**, v. 3, p. 253-266, 2003

LANDER, E.S. *et al.* International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 15, p. 860–921, 2001.

LAPRIE, C.; ABADIE, J.; AMARDEILH, M.; NET, J.L.E.; LAGADIC, M.; DELVERDIER, M. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behavior in canine cutaneous melanoma. **Vet. Dermatol.** V.12, p. 139-147, 2001

Li L.; Choi, J.; Lee, K. *et al.* DNA methylation in peripheral blood: a potencial biomarker for cancer molecular epidemiology. **Journal of Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 384-394, 2012.

LIPTAK J.M. & WITHROW S.J. Cancer of the gastrointestinal tract - oral cavity, p.456-476. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds), **Clinical Veterinary Oncology**. Elsevier, St. Louis, EUA, 2007.

LIU S.; REN, S.; HOWELL, P.; FODSTAD, O., RIKER, A.I. Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. **Pigment Cell Melanoma Res.** V. 21; p.545-58, 2008

MA, L.; CHUA, M.; ANDRISANI, O.; SO, S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: An update and future therapy perspectives. **World Journal Gastroenterology**, v.20, n.2, p. 333-345, jan.2014.

MIHAJLOVIC, M.; VLAJKOVIC, S.,POVANOVIC P., STEFANOVIC, V. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. **Int J Clin Exp Pathol.**; v.5, n.8, p. 739–753. Out. 2012

MARTINEZ-CARDÚS, A.; VIZOSO, M.; MORAN, S.; MANZANO, J.L.; Epigenetic mechanisms involved in melanoma pathogenesis and chemoresistance. **Annals of Translational Medicine**, v.3, n.15, p. 209, Set. 2015.

MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia Veterinária**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 1476 p.

MEUTEN J.D., **Tumors in domestic animals**. 5 ed. Carolina do norte: Wiley & Sons, 2017, 983p.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, I.; CAMPBELL, K.L. Muller and Kirk's **Small Animal Dermatology**. 7 ed. St. Louis, MO, USA: Elsevier Mosby, 2013; 774–843p.

MIOT, H. A.; BRIANEZI, G.; TAMEGA, A.A.; MIOT, L.D.B. Techniques of digital image analysis for histological quantification of melanin. **An Bras Dermatol.**, v.87, n.4, p.608-11, 2012

MONTEIRO, E.O. Cor da pele e pigmentos. **R.B.M. Especial Dermatologia**. V.67. dez.2010. Disponível em :< http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4484> Acesso em 15.jan.2018.

MONTROSE, L.; NOONANA, C.W.; CHO, Y.H.; LEE, J.; HARLEY J, O'HARA, T.; CAHILL, C.; WARD, T.J. Evaluating the effect of ambient particulate pollution on DNA methylation in Alaskan sled dogs: Potential applications for a sentinel model of human health. **Science of the Total Environment**, V.512–513, p.489–494, abr.2015.

MORIMOTO, C.Y.; TEDARDI, M.V.; DA FONSECA, I.I.M.; KIMURA, K.C.; SANCHES, D.S.; T.; EPIPHANIO, T.M.F.; STREFEZZI, R.F.; DAGLI, M.L.Z. Evaluation of the global DNA methylation

in canine mast cell tumour samples by immunostaining of 5-methyl cytosine. **Veterinary and Comparative Oncology**, p. 1-5, 2016.

MUKARATIRWA, S.; CHIKAFU, L.; DLIWAYO, R.; MOYO, N. Mast cells and angiogenesis in canine melanomas: malignancy and clinicopathological factors. **European Society of Veterinary Dermatology**. V. 17, p.141–146, 2006.

MURPHY, S.; HAYES, A. M; BLACKWOOD, L.; MAGLENNON, G.; PATTINSON, H.; SPARKES, A.H. Oral malignant melanoma – the effect of coarse fractionation radiotherapy alone or with adjuvant carboplatin therapy. **Veterinary and Comparative Oncology**. V. 3, N.4, p.222–229, 2005.

NAKASHIMA, J.P.; VIEGAS, C.M.; FASSIZOLI A.L.; RODRIGUES, M., CHAMON, L.A.; SILVA J.H.; DIAS, F.L.; ARAUJO, C.M. Postoperative adjuvant radiation therapy in primary head e neck mucosal melanoma. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**. V. 70, p.344-351, jan. 2008.

Nan, X.; Campoy, F.J.; Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. **Cell**, v.88, n.4, p. 471-481, fev.1997

NG, H.H.; ZHANG, Y. HENDRICH, B.; JOHNSON, C.A.; TURNER, B.M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; REINBERG, D.; BIRD, A. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex.). **Nature. Genetics**, v.23, n.1, p. 58-61. Set.1999

NG. H.H; JEPPESEN, P.; BIRD, A. Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. **Molecular and Cellular Biology**, v.20, n.4, p.1394-1406, fev.2000.

NISHIYA, A.T.; MASSOCO, C.O.; FELIZZOLA, C.L.; PERLMANN, E.; BATSCHINSKI, K.; TEDARDI, M.V.; GARCIA, J.G.; MENDONÇA, P.P.; TEIXEIRA, T.F.; DAGLI, M.L.Z. Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Vet. Sci**. V. 3, n.7., 2016.

OLIVEIRA, I.O.; JUNIOR, H.L.A. Current knowledge on the biology of melanocytes in the human hair follicle. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.331-343, jun. 2003.

ORLOW, S.J.;ZHOU, B.K.; CHAKRABORTY, A.K.; DRUCKER, M.; PIFKO-HIRST, S.; PAWELEK, J.M. High-molecular-weight forms of tyrosinase and the tyrosinase-related proteins: evidence for a melanogenic complex. **J Invest Dermatol**. v.03, n.2:p.196-201, ago.1994.

POSTOW M.A., HAMID. O.; CARVAJAL, R.D. Mucosal melanoma: pathogenesis, clinical behavior and menagement. **Curr. Onco. Rep**. V.14, n.5, p. 441-448, out. 2012

PRELICH, G.; TAN, C.K, KOSTURA, M.; MATHEWS M.B.; SO, A.G.; DOWNEY K.M.; STILLMAN, B. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA-polymerase delta. **Nature**; v.326,n.2, p.517-520,abr. 1987

PROPHET, E.B. Procesamiento de Tejidos: Deshidratación, aclaramiento y Infiltración. In: PROPHET, E.B. et al. (Eds.). **Métodos Histotecnológicos**. Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. cap. 5, p.31-34.

PROULX, D.R.; RUSLANDER, D.M.; DODGE, R.K.; HAUCK, M.L.; WILLIAMS, L.E.; HORN, B.; PRICE, G.S.; THRALL, D.E. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Veterinary Radiology and Ultrasound**. v. 44, p. 352–359,2003.

QURESHI, S.A.; BASHIR, M.U.; YAQINUDDIN, A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. **International Journal of Surgery**, v. 8, p. 194-198, 2010.

RAMÍREZ, A.E.G.; MARTÍNEZ, A.D.; DÍAZ-ANZALDÚA, A. Epigenetics and twin studies in psychiatric domains. **Salud Ment.** V.31, N. 3, jun. 2008

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. **Vet Pathol.** v. 37, n. 6, p. 597–608, 2000.

RASSNICK K.M.; RUSLANDER, D.M.; COTTER, S.M., AL-SARRAF, R.; BRUYETTE, D.S.; GAMBLIN, R.M.; MELEO, K.A.; MOORE, A.S. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989–2000). **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 218 p.1444–1448, 2001.

REQUICHA, J. F. M. F. **Neoplasias da Cavidade Oral do Cão Estudo Retrospectivo de 14 Anos.** 2010. Disponível em: < <https://repositorio.utad.pt/handle/10348/711> > Acesso em 01. jun. 2016.

REQUICHA, J.F.; Pires, M. A.; Albuquerque, C.M.; Viegas, C.A. Neoplasias da cavidade oral do cão - Breve revisão. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 37, n.1, p.41-46, mar. 2015.

Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, et al. . C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. **Virchows Arch.**;v.452, p.27-32, 2008.

ROBERTSON, K.D.; AIT-SI-ALI, S.; YOKOCHI, T.; WADE, P.A.; JONES, P.L.; WOLFFE, A.P. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. **Nature Genetics**, v.25, n.3, p.338-342, Jul.2000

ROGERS, R.S. GIBSON, L.E. Mucosal, genital, and unusual clinical variants of melanoma. **Mayo Clin Proc.** V. 72, p.362–366, 1997

ROLIM, V.M.; CASAGRANDE, R.A.; WATANABE, T.T.; WOUTERS, A.T.; WOUTERS, F; SONNE,L.; DRIEMEIER, D. Melanoma amelanótico em cães: estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesq. Vet. Bras.** V.32, n.4, p.340-346, abr.2012.

ROUNTREE, M.R; BACHMAN, K.E.; BAYLIN, S.B. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. **Nature Genetics**, v.25, n.3, p.269-277, jul.2000

Saito, R.F.; Lana, M.V.G.; Medrano, R.F.V.; Chammass, R. Fundamentos de oncologia molecular. Ed: Atheneu. São Paulo, 2016.

SANCHES, D. S. ; PIRES, C. G.; FUKUMASU, H.; COGLIATI, B.; MATSUZAKI, P.; CHAIBLE, L. M.; TORRES, L. N. ; FERRIGNO, C. R. A. ; DAGLI, M. L. Z. Expression of Connexins in Normal and Neoplastic Canine Bone Tissue. **Vet Pathol.**, v. 46,n.5, p. 846-859, mai. 2009.

SCATTONE, N.V.; DEL FAVA, C. Casuística de tumores cutâneos em cães diagnosticados pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, no período de 1996 a 2013. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, v. 12, n. 4, p. 296-305, dez. 2014.

SCHIFFMAN, J.D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with câncer. . **Philosophical Transaction Royal Society B**. abr.2015. Disponível em :<<http://rstb.royalsocietypublishing.org/>> . Acesso em 14.abr.2016

SCHULTHEISS, P. C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **J Vet Diagn Invest** .V.18, p.422–425, 2006.

SCOTT, D.W. et al. **Muller & Kirk - Dermatologia dos pequenos animais**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. 1528p.

SEETHARAMU, N.; OTT, P. A.; PAVILIK, A.C. Mucosal melanomas: a case-based review of literature the literature. **Oncologist**. N. 15, V. 7, P. 772-781, Jun. 2010.

SEVASTRE, B.; TAULESCU, M.; SARPATAKI, O.; BEDECEAN, I.; ŞTEFAN, A.C.; MARCUS, I.; CĂTOI, C. Immunohistochemical Identification of Canine Melanocytic Neoplasms and Prognostic Evaluation of Ki67 Expression. **Bulletin UASMV Veterinary Medicine**. V.69, n.1-2,2012.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P.A. Epigenetics in câncer. **Carcinogenesis** v.31 n.1, p.27–36, set. 2010.

SHARMA, N. Case Report: Primary Oral Malignant Melanoma: Two Case Reports and Review of Literature. **Case Reports in Dentistry**. 2012.

SHEN, J.; SONG, R.; WAN, J.; HUFF, C.; FANG, S.; LEE, J.E.; ZHAO, H. Global methylation of blood leukocyte DNA and risk of melanoma. **Int. J. Cancer**, V. 140, p. 1503–1509, 2017.

SILVA MSB, MENEZES LB, SALES TP, LIMA FG, PAULO NM. Tratamento de melanoma oral em um cão com criocirurgia. **Acta Scientiae Veterinarie**. 2006;34:211-213.

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.; 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 Res**. v. 27, n.1, p.37–47, Jan.2014

SMEDLEY, R.C. Review of the Prognostic Evaluation of Canine Melanomas. **Proceeding of the ACVP/ASVCP Concurrent Annual Meetings**. Nov.2010

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, 2011.

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

SOUZA, T. M. FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 555-560, abr.2006.

SPANGLER, W.L.; KASS, P.H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic consideration in canine melanocytic neoplasia. *Vet. Pathol.* **2006**, 43, 136–149.

SULTAN, F.; GANAIE, B. A. Comparative oncology: Integrating human and veterinary medicine. **Open Veterinary Journal**, v. 8 n.1, p. 25-34, 2018.

TANAKA, N.; AMAGASA, T.; IWAKI, H.; SHIODA, S.; TAKEDA, M.; OHASHI, K.; RECK, S.F. Oral malignant melanoma in Japan. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1994 Jul;78(1):81-90.

TEIXEIRA, T. F. Melanomas melânicos e amelanóticos da cavidade bucal de cães: aspectos epidemiológicos, morfológicos e moleculares. **Tese de doutorado**. 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-19102012-082041/pt-br.php>> Acesso em 22.abr.2016

Teixeira TF, Gentile LB, da Silva TC, Menecier G, Chaible LM, Cogliati B, Roman MA, Gioso MA, Dagli ML. Cell proliferation and expression of connexins differ in melanotic and amelanotic canine oral melanomas. *Vet Res Commun.* 2014 Mar;38(1):29-38. doi: 10.1007/s11259-013-9580-z. Epub 2013 Oct 15.

TELLEZ, C.S.; SHEN, L.; ESTÉCIO, M.R.; JELINEK, J.; GERSHENWALD, J.E.; ISSA, J.P. CpG island methylation profiling in human melanoma cell lines. **Melanoma Res.** v.19, n.3, p.146-55. Jun.2009.

Todoroff RJ, Brodey RS: Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. **J Am Vet Med Assoc.** v. **175**, p. 567–571, 1979.

TORANO, E.G.; PETRUS, S.; FERNANDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. **Clin Chem Lab Med**, v.50, n.10, p.1733–1742, 2012.

VERHAERT L. Oral proliferative lesions in dogs and cats. In: Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Congress. Vancouver, Canadá, 2001

VERSTRAETE FJ. Mandibulectomy and maxillectomy. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2005;35:1009-1039

Vos, J. H.; Gaag; I. V. D. Canine and Feline Oral-Pharyngeal Tumours **J. Vet. Med. A.** V. 34, n., P. 420-427, 1987

WEISS, E.; FREZE, K. Tumours of the Skin. **Bulletin of the World Health Organization—International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals**, v.50, n.1-2, p.79-100, 1974.

World Health Organization . (Org.). **Skin cancers**. WHO, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>> Acesso em: 13 abr. 2016

WITHROW, S.J.; VAIL, M. D. **Small animal clinical oncology**. 5. ed. St Louis: Saunders, 2013, 846p.

Woo, H.D.; Kim, J. Global DNA hypomethylation in peripheral blood leukocytes as a biomarker for cancer risk: a meta-analysis. **PLoS**, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2012.

Wu, H.C.; Wang, Q.; Yang, H.I; Tsai, W.Y.; Chen, C.J.; Santella, R.M. Global DNA methylation levels in white blood cells as a biomarker for hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7, p. 1340-1345, 2012.

YAMAYA, Y.; SUGIYA, H.; WATARI, T. Methylation of free-floating deoxyribonucleic acid fragments in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with chronic bronchitis exposed to environmental tobacco smoke. **Irish Veterinary Journal**, n.68,v.7, p.1-4, 2015.

Yamaya, Y.; Sugiya, H.; Watari, T. Methylation of free-floating deoxyribonucleic acid fragments in the bronchoalveolar lavage fluid of dogs with chronic bronchitis exposed to environmental tobacco smoke. **Irish Veterinary Journal**, v. 68, n. 7, p. 1-4, 2015.

YOU, J.S.; JONES, P.A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer Cell**, v.22, n.1, p. 9-20, jul.2012.

ZINELLU, A.; SOTGIA, S.; MURTAS, V.; COSSU-ROCCA P, DE MIGLIO, M.R.; MURONI M.R.; MOURA, A.; URAS, M.G.; CONTINI, M.; DEIANA, L.; CARRU, C. Evalution of Methylation degree from formalina-fixed paraffin-embedded DNA extract by field-amplified sample injection capillary electrophoresis with UV detection. **Anal Bioanm Chem**, v. 399 p.1181-1186, 2011.

11. Anexos

ANEXO 1: Carta de Aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação da metilação global do DNA em melanomas melânicos e amelanóticos da cavidade oral de cães.", protocolada sob o CEUA nº 9522230517, sob a responsabilidade de **Maria Lucia Zaidan Dagli** e equipe: **Nayra Villar Scattone** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/12/2017.

We certify that the proposal "Comparison of DNA global methylation in canine melanotic and amelanotic buccal melanomas.", utilizing 20 Dogs (males and females), protocol number CEUA 9522230517, under the responsibility of **Maria Lucia Zaidan Dagli** and team: **Nayra Villar Scattone** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/13/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 06/2017 a 06/2019

Área: **Patologia Experimental E Comparada**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 15 anos**

N: **20**

Linhagem: **qualquer raça**

Peso: **1 a 15 kg**

Resumo: A medicina humana e medicina veterinária podem combinar descobertas científicas, entender mais rapidamente as origens do câncer e traduzir esses achados em novas terapias, beneficiando humanos e animais com a oncologia comparativa. Compreender as alterações genéticas e epigenéticas das neoplasias é essencial para prever o comportamento biológico e instituir novas terapias para o câncer. Os melanomas são agressivos e multi-resistentes, sendo um dos tipos tumores sólidos epigeneticamente menos conhecidos. Desta forma, seu estudo tem grande importância para a oncologia veterinária como também para a oncologia humana. O objetivo deste projeto será avaliar a metilação global do DNA em melanomas orais de cães, comparando com o fenótipo e a morfologia celular. Para um primeiro estudo retrospectivo as amostras em blocos parafinados serão obtidas de arquivos de serviços de patologia veterinária no período de 2 anos (2014-2015). As lâminas histológicas coradas em H.E. serão revisadas quanto ao seu diagnóstico histopatológico, e os dados epidemiológicos desses cães também serão registrados. A metilação global será avaliada por meio de imunistoquímica utilizando o anticorpo anti-5 metil citosina; a proliferação celular será avaliada com o anticorpo Ki-67. Será feita a contagem de 1000 núcleos positivos para 5 metil citosina, classificando-os quanto a intensidade de marcação. Dos mesmos tecidos incluídos em parafina, será extraído o DNA utilizando o Kit QIAamp® (QIAGEN), e submetidos a técnica de HPLC para quantificar a metilação global de DNA. Um segundo estudo, prospectivo, serão coletadas amostras teciduais de melanomas orais de cães e sangue dos mesmos pacientes. Além de avaliar a metilação global do DNA nas amostras tumorais por imunistoquímica também será avaliada a metilação global de DNA em leucócitos com kit Gentra Puregene® (QIAGEN). Desta forma, espera-se obter o grau de metilação global do DNA de cães com melanoma, para compreender suas alterações moleculares e futuramente, além da possibilidade de ser usado como um biomarcador de detecção e prognóstico do câncer, poderemos determinar melhores formas de tratamento, as quais sejam capazes de interferir especificamente nas células tumorais que estão molecularmente alteradas, e proporcionar melhor qualidade e expectativa de vida.

Local do experimento: **clínicas veterinárias particulares.**

São Paulo, 15 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

ANEXO 2: Carta de Aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “Comparação da metilação global do DNA em melanomas melânicos e amelanicos da cavidade oral de cães”, registrada com o nº 997/2018, sob a responsabilidade de Maria Lucia Zaidan Dagli e Náyra Villar Scattone, apresentada pelo ICESP - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 07.02.18.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 16-09-2016 Término: 16-09-2019
Espécie/linhagem/raça	Material estocado de cães
Nº de animais	Não se aplica
Peso/Idade	1 a 15 anos
Sexo	Machos/fêmeas
Origem	HOVET-USP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 07 de Fevereiro de 2018

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais