UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THIAGO HENRIQUE MORONI VARGAS

**Caracterização imuno-histoquímica da Galectina-3 como ferramenta
prognóstica em melanomas orais caninos**

Pirassununga

2018

THIAGO HENRIQUE MORONI VARGAS

**Caracterização imuno-histoquímica da Galectina-3 como ferramenta
prognóstica em melanomas orais caninos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo De Francisco Strefezzi

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

VV297c Vargas, Thiago
Caracterização imuno-histoquímica da Galectina-3
como ferramenta prognóstica em melanomas orais
caninos / Thiago Vargas ; orientador Ricardo
Strefezzi. -- Pirassununga, 2017.
125 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Galectina-3. 2. Melanoma. 3. Prognóstico. 4.
Apoptose. I. Strefezzi, Ricardo, orient. II. Título.

VARGAS, Thiago Henrique Moroni

Caracterização imuno-histoquímica da Galectina-3 como ferramenta
prognóstica em melanomas orais caninos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Aprovado em: 02/02/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Heidge Fukumasu

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Profa. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária (UNESP-Araçatuba)

Prof.Dr. Daniel Ferro

Instituição: Centro Odontológico Veterinário (ODONTOVET)

Agradecimentos

“Deus é verbo, não é substantivo”

Tenho uma concepção muito particular sobre Deus, talvez por isso me considere “sem religião”. Para mim, Deus, se encontra nas ações de bondade que fazemos na vida dos outros. Neste espaço, quero agradecer a todos que trouxeram Deus na minha vida.

Em primeiro lugar, tenho que agradecer a pessoa mais importante de toda minha vida. Que me deu educação e carinho. Me ensinou sobre o amor e amizade. Me mostrou que o mais importante na vida é o conhecimento. Sempre me apoiou em qualquer decisão e me protegeu do mundo. Infelizmente não posso mais conversar com você em palavras, não posso tirar sarro da sua cara quando estiver brava, não posso evitar as lágrimas quando escrevo sobre você. Na verdade, tem quem diga que o Alzheimer está te levando aos poucos, mas você sempre esta comigo. Em cada sorriso, em cada carinho, em cada beijo melado, eu sinto sua presença viva e forte. Hoje eu aprendi mais uma coisa com você. Hoje eu valorizo as menores coisas do mundo. Mesmo depois de tanto tempo e com tudo que passamos, você ainda está me ensinando sobre a vida. Mais uma vez, obrigado Mãe! Te amo hoje e para todo sempre.

Tenho que agradecer ao meu querido Pai. Seu Vargas, se um dia eu for um décimo da pessoa que você é, já me considerarei feliz. Tenho um orgulho imenso de ser seu filho e aprendi com você todo o respeito e valores que um pai pode ensinar. Talvez o principal valor que pode te definir, é o amor incondicional. A forma mais pura e perfeita que conheço de amor, é o sentimento de meu pai pela minha mãe. Sei que por muitas vezes pode fraquejar e não consigo imaginar por tudo que tem passado, mas cada dia de luta se mostrou mais e mais apaixonado. Obrigado por cuidar da nossa loira, por estar sempre com um sorriso no rosto, por estar sempre de bom humor, por me ensinar como ser um homem de família. Você é meu maior orgulho e inspiração na vida. Te amo hoje e para todo o sempre.

Ao meu irmão, meu melhor amigo. Obrigado por que faz pelos nossos pais e por mim. Nesses 26 anos de convivência, você sempre me ajudou e me

deu os toques de como a vida funciona. Quando nossos pais não podiam me ajudar, você estava lá para ser um exemplo (ou não) e me guiar pelo caminho certo. Por muitas vezes teve que me educar seu irmão mais novo, e o fez muito bem. Obrigado por nos trazer as duas crianças mais lindas que já vi e ter me dado a honra de ser padrinho de uma delas. Estarei sempre que vocês e elas precisarem.

A minha namorada, Letícia. Meu amor. Meu par por opção. A pessoa que escolhi para passar o resto da minha vida. Você é a pessoa mais presente da minha vida, não só neste mestrado, mas desde 24 de março de 2010. Obrigado por todo apoio incondicional e os milhões de momentos de felicidade que ajudaram a continuar nas lutas do dia a dia. Quero te fazer a mulher mais feliz do mundo, quero te dar o amor que aprendi com os meus pais. Você é uma inspiração de luta e perseverança. Você é o motivo de acordar todas as manhãs.

Aos meus tios, Zeca e Ana, que mesmo sem obrigação nenhuma, me deram apoio e força para continuar ao longo de todo o curso. Sempre estavam de bom humor e prontos para ajudar. Essa conquista dependeu muito de vocês dois. Nosso amor supera todas as distâncias.

Aos meus sogros e minha cunhadas, Dona Renata, Seu Mauro, Isa, Gabi, Seu Toninho e Dona Marlei, obrigado por me adotarem nessa família unida e maravilhosa. Agradeço por todos finais de semana que fui considerado da família e pude aproveitar todo o amor de vocês, espero estar com vocês o resto da vida.

Ao meu orientador, Ricardo, que desde que sugeri ideias para um mestrado, sempre me recebeu de braços abertos. Um espelho profissional e pessoal. Me permitiu crescer como profissional, seja ensinando ou dando oportunidades de aprender. Nunca entregou nada, mas ensinou a fazer. Sempre muito solícito e compreensivo, sem dúvida, um dos principais responsáveis por este trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por ter concedido a bolsa para realização do projeto (processo 2015 11959-2), que permitiu o desenvolvimento do projeto e a manutenção do aluno na cidade da pesquisa. Além de possibilitar participação em congressos da área.

Aos colegas de laboratório, Lídia, Profº Heidge, Pedro, Yonara, Pamela, Camila, Pedrinho, Nilton, Lindsay, Nina, Julia, por toda ajuda nos assuntos laboratoriais e profissionais, caronas para o almoço, amizades e companheirismo.

As alunas de IC do laboratório, Bruna, Isabela, Raquel, Marina, Gabriela, Lais, sempre ajudando em todos os deveres da rotina, mesmo que não sendo exigidas. Obrigado pelo companheirismo, tenho certeza que todas se tornarão excelente profissionais.

Aos amigos de república Dominacama/Vale Tudo, Fluffy, Mifod, Desastre, Pedro, Strogo, Birruga, Baitola, Gil, Xibungo, Robertinho, Cuba, Roca, Tio Chico, Miagui, Leitão por todo companheirismo, rolês, churrascos, conversas ao longo de todo mestrado e graduação. Espero ter a amizade de cada um de vocês pelo resto da vida.

Aos amigos de São Paulo, Ricardo, Nariz, Matheus, Victor, Moita, Cido, Caio, Tainan, Shirlei, Greg, Xexe, Igor, Pipoca, Emo, Kruci, Kaléo, Pisano, pela amizade ao longo de tanto tempo que sempre me animou aos finais de semana, me dando forças para continuar. A amizade de vocês será para o resto da vida, estarão sempre na minha memória.

Aos amigos do vôlei, Danilo, Palu, Jaiber, Kazu, Dalsin, Num, Danete, Victoria, Canga, Giovani e Matheuses, pela distração em momentos delicados. Por tornarem o hobbie das terças e quintas, uma paixão e uma amizade para toda a vida.

Aos colegas veterinários do Hospital Veterinários da FZEA, em especial Pedro, Jeff, Raíssa, Marília, Julia, Gonçalo, Guilherme, Endrew, Adriele, Daiana, Thamiris, por toda ajuda na rotina do hospital, caronas para o almoço, churrascos de confraternização e as amizades conquistadas ao longo desses anos.

Aos amigos do Barba Ruiva, Saque, Sandy e Zena, uma grata surpresa foi poder tocar com vocês. Cantar com vocês é uma honra e uma satisfação vestir a camisa do Barba.

“Sua jornada diligente faz valer o sacrifício.”

Vitor Isensee

Resumo

Os melanomas correspondem a 7% de todas as neoplasias malignas em cães e são principalmente encontrados em cavidade oral e lábios, correspondendo a 33% dos tumores de boca, possuem um prognóstico ruim devido ao fato de serem diagnosticados tardiamente, por sua grande capacidade de invasão local e formação de metástases, além de altas taxas de recidiva após o tratamento cirúrgico. A Galectina-3 (Gal-3) é uma proteína responsável por diversas funções fisiológicas como adesão, apoptose, angiogênese, proliferação e diferenciação. Em medicina veterinária existem poucos estudos relacionando à expressão da Gal-3 com prognóstico e a progressão da neoplasia. Realizamos imuno-histoquímica para Gal-3 em 27 melanomas orais caninos que foram avaliados de maneira semiquantitativa e quantitativa, e comparamos os resultados obtidos com a sobrevida, outros marcadores prognósticos (Ki67, índice mitótico e atipia nuclear), expressão de proteínas relacionadas à apoptose (BCL2 e CASP3) e parâmetros histopatológicos (grau de pigmentação e tipo histológico). Detectamos alta expressão de Gal-3 em melanomas com maior sobrevida pós-cirúrgica e uma alta expressão nuclear de Gal-3 em melanomas com menor sobrevida pós-cirúrgica. Além disso, houve correlação entre as expressões de Gal-3 e BCL2, assim como entre atipia nuclear e sobrevida pós-cirúrgica. É sabido que a Gal-3 é capaz de formar heterodímeros com a BCL2 no citoplasma para atuar na evasão da morte por apoptose, impedindo a liberação da citocromo C. Já no núcleo, a Gal-3 induz à parada do ciclo celular, reduzindo a taxa da proliferação. Apesar do reduzido número amostral devido à dificuldade nos acompanhamentos clínicos nossos dados permitem sugerir que a Gal-3 possui potencial para ser um marcador prognóstico de sobrevida em casos de melanomas orais caninos. Novos estudos devem ser realizados afim de confirmar nossas observações e elucidar o papel da Gal-3 nesta neoplasia.

Palavras chave: Apoptose, Galectina 3, Melanoma, Núcleo, Prognóstico

Abstract

Melanomas are almost 7% of all malignant neoplasms in dogs. They are mainly found in the oral cavity and lips, corresponding to 33% of tumors of the oral cavity. They carry a poor prognosis because of late diagnoses, local invasiveness, high metastatic and recurrence rates after surgical treatment. Galectin-3 (Gal-3) is a protein with a variety of biological roles such as in adhesion, apoptosis, angiogenesis, proliferation and differentiation. In veterinary medicine, there are few studies comparing the expression of Gal-3 with prognosis and tumor progression. We performed immunohistochemistry for Gal-3 in 27 canine oral melanomas and evaluated the immunolabelling both semi-quantitatively and quantitatively. The results were compared with survival, other prognostic markers (Ki67, mitotic index and nuclear atypia), expression of proteins related to apoptosis (BCL2 and CASP3) and histopathological parameters (degree of pigmentation and histological type). We detected higher expression of Gal-3 in cases of melanoma that presented longer post-surgical survival and a higher nuclear expression of Gal-3 in dogs with melanoma that had shorter post-surgical survival. In addition, there was correlation between the Gal-3 and BCL2 expressions, as well as between nuclear atypia and post-surgical survival. It is known that Gal-3 is able to form heterodimers with BCL2 in the cytoplasm leading to evasion of apoptosis, through preventing mitochondrial cytochrome C release. Nuclear Gal-3 induces the cell cycle arrest, reducing the proliferation rate. Despite the small sample size due to the difficulty in clinical follow-up, our data suggest that Gal-3 has the potential to be a prognostic marker for survival in cases of canine oral melanomas. Further studies should be performed to confirm our observations and elucidate the role of Gal-3 in this neoplasm.

Keywords: Apoptosis, Galectin 3, Melanoma, Nuclei, Prognostic

Lista de abreviaturas

Gal-3 – Galectina-3
UV – Ultravioleta
TYRP1 – proteína relacionada a tirosinase 1
TYRP2 – proteína relacionada a tirosinase 2
MC1R – receptor de melanocortina 1
 α -MSH – hormônio estimulador de melanócitos α
ACTH – hormônio adrenocorticotrófico
ASP – antagonista de sinalização agouti
TP53 – gene que codifica a proteína p53 (reparo de DNA)
RB1 - gene que codifica a proteína retinoblastoma (controle da replicação)
CDK – quinases dependentes de ciclina
CDKN1A – gene que codifica a proteína p21 (inibidor de CDKs)
INK4 – inibidor das quinase dependente de ciclina
BRAF – gene que codifica a proteína B-Raf (proto-oncogene)
MAPK – quinases ativadoras de mitoses
CD44 – proteína de adesão celular
NRAS – oncogene viral RAS do neuroblastoma (controle de crescimento)
PTEN – homólogo da fosfatase e tensina (supressor tumoral)
c-KIT – oncogene que codifica a proteína tirosina quinase Kit (controle de crescimento)
HMB-45 – Human melanoma black
Mel-1 – linhagem celular de melanócitos derivado de metástases
PMEL17 – proteína pré-melanossomo
Melan-A ou MART-1 – antígeno associado a melanócito reconhecido por linfócitos T
Ki67 – proteína expressa na fase ativa do ciclo celular
HPF – *high power fields*
ECT – eletroquimioterapia
TNF α – fator de necrose tumoral α
PEG – polietilenoglicol
FasL – ligante de Fas
TAAs – antígenos associados ao tumor
CRD – domínios reconhecedores de carboidratos
LGALS-3 – gene que codifica a proteína Galectina-3

MMP-2 – metaloproteinase 2

MMP-9 – metaloproteinase 9

BCL2 – linfoma de células B 2 (proteína anti-apoptótica)

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

bFGF – fator de crescimento básico de fibroblasto

FAK – quinase focal de adesão

VEGFR2 – receptor do fator de crescimento endotelial vascular

IL-6 – interleucina 6

G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos

TGF β -1 – fator de crescimento transformante beta 1

ILK – quinases ligadas a integrinas

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

K-ras – proto-oncogene relacionado a proliferação e crescimento celular

uPAR – receptores ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase

Rac1 – substrato RAS relacionado a toxina botulínica

LPS – lipopolissacarídeos

CASP3 – Caspase 3

TMA – Tissue Micro Array

Lista de ilustrações

Figura 1. Esquema representativo da relação entre melanócitos e queratinócitos na epiderme. A comunicação se dá por meio dos dendritos dos melanócitos e por ação de ligantes como E-caderina, desmoglina e conexinas.....**24**

Figura 2. A- Nódulo enegrecido em região de palato duro com diagnóstico de melanoma oral canino. B- Metástase de melanoma oral canino em úmero de cão. C- Presença de nódulos multifocais enegrecidos em pulmão devido a metástase por melanoma oral canino. D- Fragmento de pulmão com metástase de melanoma oral canino.....**30**

Figura 3. Aspectos morfológicos do exame citológico das neoplasias melanocíticas. A- Melanocitoma em cão – presença de células isoladas epitelioides (seta escura) ou alongadas (seta clara) sem nucléolos evidentes, cromatina densa e grande quantidade de melanina no citoplasma. B- Melanoma amelanótico em cão – células com elevado grau de pleomorfismo, variada proporção núcleo:citoplasma, nucléolos evidentes, sem presença de melanina visível. C- Melanoma amelanótico em cão – “poeira cinza” importante para diagnóstico em melanomas amelanóticos. D- Melanoma balonoso em cão – citocentrifugado com diversas células vacuolizadas. Coloração de Wright, objetiva 10x.....**36**

Figura 4. Neoplasia melanocítica canina. A- Melanócitos bem diferenciados com núcleos pequenos, nucléolos centrais, cromatina dispersa e fino cordão se estendendo do nucléolo à membrana nuclear (seta). Pequena variação de tamanho e formato dos melanócitos, H&E, 40X. B- Melanócitos pouco diferenciados com múltiplos nucléolos, anisocariose proeminente, pleomorfismo (seta vertical) e um melanócito típico com nucléolo único e central (seta horizontal), H&E, 40X.....**43**

Figura 5. A- Os seis primeiros *hallmarks* do câncer: manutenção do sinal proliferativo, evasão de supressores de crescimento, capacidade de se replicar infinitamente, invasão e formação de metástases, angiogênese e resistência à apoptose. B- Os quatro novos *hallmarks*, adicionados em 2011 pelo mesmo grupo: promoção tumoral pela inflamação, evasão do sistema imune, desregulação do metabolismo energético e instabilidade genômica e mutações.....**54**

Figura 6. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Escore 1 de porcentagem de Gal-3 (0-25% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); B- Escore 2 de porcentagem de Gal-3 (26-50% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); C- Escore 3 de porcentagem de Gal-3 (51-100% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); D- Controle negativo para reação do anticorpo Gal-3 com IgG de camundongo (40x). Hematoxilina de Harris.....**70**

Figura 7. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Escore 1 de intensidade de marcação da Gal-3 (fraca), não sendo possível notar marcação na objetiva de 10x; B- Escore 2 de intensidade de marcação da Gal-3 (forte), sendo possível verificar marcação na objetiva de 10x, porém a localização da marcação não é clara; C- Escore 3 com intensidade de marcação da Gal-3 (muito forte), sendo possível notar a localização da marcação na objetiva de 10x; D- Controle negativo da reação do anticorpo Gal-3 com IgG de camundongo (40x). Hematoxilina de Harris.....**71**

Figura 8. Gráficos de correlação dos escores de expressão de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica. A- Gráfico de correlação entre escore de porcentagem de marcação geral (núcleo e citoplasma) de Gal-3 e sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0,0014$, $r = 0,4758$). B- Gráfico de correlação entre escore de porcentagem de núcleos marcados com

sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0,0065$, $r = -0,5197$). As retas demonstram a tendência dos dados.....**74**

Figura 9. Gráficos de comparação entre grupos de sexo e tipo histológico com relação a contagem de núcleos marcados com Gal-3. A- Gráfico da comparação entre fêmeas ($42,40 \pm 2,965$) e machos ($55,45 \pm 3,374$) referente à contagem de núcleos que expressam Gal-3 ($p = 0,0112$). B- Gráfico da comparação entre tumores epitelioides ($38,17 \pm 5,196$) e mistos ($52,85 \pm 2,709$) referente à contagem de núcleos que expressam Gal-3 ($p = 0,0262$).....**75**

Figura 10. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Melanoma melânico com presença de pigmento acastanhado citoplasmático. B- Melanoma amelanótico em que o pigmento citoplasmático está ausente. Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.....**78**

Figura 11. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Amostra com alta taxa mitótica por campo (setas). B- Amostra com baixa taxa mitótica por campo (seta). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.....**79**

Figura 12. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Predomínio do tipo celular epitelióide. B- Melanoma do tipo misto, composto por células epitelioides (seta amarela) e células fusiformes (seta vermelha). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.....**80**

Figura 13. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Amostra com escore alto de atipia nuclear (64% das células – escore 7). B- Amostra com escore baixo de atipia nuclear (27% das células – escore 3). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.....**81**

Figura 14. Gráficos relacionando atipia nuclear com a sobrevida de animais com melanoma oral canino. A- Gráfico de correlação entre escore de atipia nuclear e sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0,0008$, $r = -0,6153$), a reta demonstra uma tendência nos dados. B- Análise de sobrevida por Kaplan-Meier determinando o escore 4 como ponto de corte entre os grupos ($p = 0,0004$, mediana de sobrevida para grupo com alto grau de atipia = 173 dias, mediana de sobrevida para grupo com baixo grau de atipia = 486 dias).....**83**

Figura 15. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação nuclear positiva de amostra com alta contagem de Ki67 ($\mu = 58,2$) e marcação de figura de mitose (seta); B- Marcação nuclear positiva de amostra com baixa contagem de Ki67 ($\mu = 14,5$). Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.....**85**

Figura 16. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação citoplasmática positiva de amostra com baixa intensidade de BCL2; B- Marcação nuclear positiva de amostra com alta intensidade de BCL2. Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.....**85**

Figura 17. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação citoplasmática de <1% das células neoplásicas (escore 1). B – Marcação citoplasmática de >1% das células neoplásicas (escore 2). Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.....**86**

Lista de Quadros

Quadro 1. Resumo dos anticorpos e procedimentos imuno-histoquímicos para diluição, recuperação antigênica e bloqueio de proteínas inespecíficas para cada anticorpo do estudo (Gal-3, Ki67, Cocktail, BCL2 e CASP3).....	64
Quadro 2. Distribuição de casos de melanoma oral canino segundo nossos números de controle: sexo, raça, idade, sobrevida e localização da lesão, São Paulo, 2016.....	68
Quadro 3. Dados da análise de imunomarcção de Gal-3 em melanomas orais caninos.....	69
Quadro 4. Distribuição das lesões analisadas em função do grau de pigmentação, tipos histológicos, índice mitótico e escores de atipia nuclear.....	77
Quadro 5. Valores de média da contagem da marcação nuclear de Ki67, escores de intensidade e porcentagem de marcação nuclear de BCL2 e escore de porcentagem de marcação citoplasmática de CASP3 em melanomas orais caninos.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resultados dos Testes t de Mann-Whitney comparando os escores de marcação de Gal-3 com as variáveis de sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito em função do tumor e sobrevida maior que 1 ano. *diferença estatística.....	72
Tabela 2. Resultados análise de correlação comparando marcação de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica e marcadores prognósticos e de apoptose. *diferença estatística.....	73
Tabela 3. Resultados do Teste t não-pareado comparando contagem de Gal-3 entre grupos das variáveis sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito devido ao tumor, sobrevida maior que 1 ano. * diferença estatística.....	75
Tabela 4. Resultados análise de correlação comparando a contagem de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica e marcadores prognósticos e de apoptose. *diferença estatística.....	76
Tabela 5. Resultados da análise de sobrevida para os marcadores histológicos e do teste t de Mann-Whitney entre grupos das variáveis de óbito devido ao tumor e sobrevida maior que 1 ano e * diferença estatística.....	82
Tabela 6. Resultados dos testes estatísticos para comparações entre índice de Ki67, porcentagem de células marcadas e intensidade de marcação para BCL2 e escores para CASP3 <i>versus</i> variáveis de sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito em função do tumor e sobrevida maior que 1 ano e correlação com a sobrevida.....	87
Tabela 7. Resultados dos testes de correlação dos marcadores imuno-histoquímicos (Ki67, BCL2 e CASP3) entre si e com parâmetros histopatológicos (atipia nuclear, índice mitótico, grau de pigmentação e tipo histológico).....	88

Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão da Literatura	21
2.1 Histórico e Nomenclatura	21
2.2 Melanócitos	21
2.2.1 Produção da Melanina	23
2.2.2 Carcinogênese do Melanócito	24
2.3 O Melanoma	27
2.3.1 Incidência e Importância	27
2.3.2 Predisposição Racial, Sexual e Etária	31
2.3.3 Aparência Macroscópica	32
2.3.4 Diagnóstico	33
2.3.5 Prognóstico	39
2.3.6 Tratamento	46
2.4 Galectina-3	51
2.4.1 Estrutura e Função	51
2.4.2 Galectina-3 e os Hallmarks of Cancer	53
2.4.3 Galectina-3 em Neoplasias	58
3. Material e Métodos	61
3.1 Origem do Material e Critérios de Inclusão e Exclusão	61
3.2 Processamento Histopatológico	61
3.3 Processamento Imuno-histoquímico	62
FONTE: Própria autoria	63
3.4 Avaliação de parâmetros histopatológicos	63
3.5 Avaliação das Imunomarcações	64
3.6 Análise Estatística	65
4. Resultados	66
4.1 Avaliação da População Estudada	66
4.2 Avaliação das Marcações Imuno-histoquímicas de Galectina-3	67
4.2.1 Análise semiquantitativa da expressão de Gal-3	68
4.2.2 Análise quantitativa da expressão de Gal-3	73
4.3 Avaliação dos demais marcadores	75
4.3.1 Parâmetros histopatológicos	75
4.3.2 Marcadores moleculares	82

5. Discussão	88
5.1 Avaliação da população estudada	88
5.2 Análise semiquantitativa da expressão de Gal-3	91
5.3 Análise quantitativa da expressão de Gal-3	94
5.4 Análise de parâmetros histopatológicos	95
6. Conclusões	96
7. Referências Bibliográficas	97

1. Introdução

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre a biologia neoplásica e das suas formas de tratamento, o câncer ainda possui altas taxas de morbidade e mortalidade (ARGYLE; BLACKING, 2008). De acordo com o *Cancer Research UK* (CRUK, 2012), em todo o mundo foram realizados 14.1 milhões de novos diagnósticos de câncer com 8.2 milhões de mortes. Além de toda carga emocional que o diagnóstico de câncer traz, há um grande impacto econômico relacionado a perda de produtividade e custo com tratamentos (PANG; ARGYLE, 2016). Segundo a *American Cancer Society*, o impacto econômico causado pelo câncer em 2008 foi de US\$ 895 bilhões.

Cerca de 45 milhões de famílias dos Estados Unidos possuem pelo menos um cão como animal doméstico, gerando um gasto aproximado de 15 bilhões de dólares em assistência veterinária (PET OWNERSHIP & DEMOGRAPHICS SOURCEBOOK, 2012). O custo com tratamento de cães é o segundo maior investimento na área da saúde (PATTERSON, 2000). Esses dados mostram a importância do cão na sociedade atual, não sendo considerado mais um animal doméstico, mas um membro da família.

A incidência de câncer em cães é de aproximadamente 1 em cada 3 animais (PANG; ARGYLE, 2009). O tratamento desta doença tem sido aprimorado nos últimos 20 anos, com aumento de clínicas especializadas e acessibilidade aos proprietários (PANG; ARGYLE, 2016), porém ainda é considerada uma das principais causas de morte em animais de companhia (ARGYLE; BLACKING, 2008; PANG; ARGYLE, 2016).

Os estudos em cães servem de modelo para compreensão de diversas doenças complexas, incluindo o câncer. Dentre os aspectos que possibilitam ou facilitam estes estudos, destacamos a convivência no mesmo ambiente (PANG; ARGYLE, 2016), a capacidade dos cães de desenvolverem neoplasias espontaneamente (TAMBURINI et al., 2009) e o fato de que os tumores caninos possuem aspectos histopatológicos semelhantes, algumas vezes respondendo de maneira similar aos tratamentos convencionais (PAOLONI; KHANNA, 2008).

Os melanomas correspondem a 7% de todas as neoplasias malignas em cães (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002) e são principalmente encontrados em cavidade oral e lábios, correspondendo a 33% dos tumores de boca (BOLON; CALDERWOOD MAYS; HALL, 1990; BRODEY, 1970; GORLIN et al., 1959; HARVEY et al., 1981). Os melanomas orais caninos possuem um prognóstico ruim devido ao fato de serem diagnosticados tardiamente, por sua grande capacidade de invasão local e formação de metástases, além de altas taxas de recidiva após o tratamento cirúrgico.

O tratamento de escolha para cães com melanoma não-metastático é a excisão cirúrgica, devido à sua rapidez, capacidade curativa e baixo custo quando comparada a outros meios de tratamento. O sucesso da cirurgia dependerá da localização neoplásica e sua extensão. Apesar de ter um aspecto inerente de morbidade para o animal, está associada com maior satisfação dos proprietários. Em casos de comprometimento de margens, locais de difícil acesso cirúrgico ou presença de metástases distantes é necessário proceder a tratamentos adjuvantes como radioterapia, imunoterapia entre outros (BERGMAN, 2007).

Marcadores prognósticos e preditivos são, cada vez mais, objetos de estudos em medicina veterinária. São utilizados para determinar a progressão da doença e, algumas vezes, o tratamento adequado para cada caso. Com o aumento das opções de tratamento oncológico, os tutores exigem toda informação possível acerca das possibilidades de tratamento, como custo, potenciais efeitos deletérios e impactos emocionais para a família (WEBSTER et al., 2011).

A Galectina-3 (Gal-3) é uma proteína responsável por diversas funções fisiológicas como adesão, apoptose, angiogênese, proliferação e diferenciação (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Com relação às neoplasias humanas, as investigações sobre Gal-3 mostram resultados variáveis, algumas vezes relacionando a maior expressão desta proteína ao pior prognóstico, outras vezes apresentando resultados opostos (SONG et al., 2014). Para melanomas, especificamente, o aumento da expressão de Gal-3 é relacionado à maior sobrevida (BROWN et al., 2012), diferentemente de tumores de pele não melanocíticos que não apresentavam relação da Gal-3 com prognóstico

(KAPUCUOGLU et al., 2009). Em medicina veterinária existem poucos estudos relacionando à expressão da Gal-3 com prognóstico e a progressão da neoplasia (OLIVEIRA et al., 2014) e, até o momento, este é o primeiro estudo avaliando a expressão de Gal-3 em melanomas orais em qualquer espécie.

O objetivo do presente estudo é caracterizar a expressão imuno-histoquímica de Gal-3 em melanomas orais de cães e comparar com a sobrevida dos pacientes. Além disso, avaliamos marcadores prognósticos consolidados dos melanomas orais caninos, como atipia nuclear, grau de pigmentação, índice mitótico e índice de Ki67. Adicionalmente, verificamos a expressão de proteínas relacionadas com a apoptose, BCL2 e CASP3, com o intuito de avaliar possíveis relações da Gal-3 na evasão apoptótica da neoplasia.

2. Revisão da Literatura

2.1 Histórico e Nomenclatura

Os tumores pigmentados são conhecidos desde a antiguidade, chamados por Celsius como “*melas*”, palavra grega que significa “negro”. Em 1806, Laennec (1806, apud BABA; CATOI, 2007) introduziu o termo “*melanosis*” para desordens pigmentares da pele. Carswell (1837, apud BABA; CATOI, 2007) propôs o termo “melanoma” para tumores malignos pigmentares.

Virchow classificou os melanomas de acordo com sua estrutura macroscópica em: melanoma simples, formado por aglomerados celulares em meio a tecido conjuntivo; melanocarcinoma, com células epiteliais arranjadas em cordões ou em padrão alveolar; e melanossarcoma, formado por células fusiformes. Em 1969, Clark e colaboradores classificaram os tumores pigmentares estimando o nível de invasão dependendo do comprometimento de estruturas anatômicas da pele. Um ano depois, Breslow propôs que o grau de malignidade do melanoma pode ser obtido pela espessura da invasão tumoral (BRESLOW, 1970).

Muito se discute sobre a nomenclatura das neoplasias melanocíticas. No presente estudo, utilizaremos o termo “melanoma” para neoplasia maligna de melanócitos, “melanocitoma” para neoplasia benigna de melanócitos, e “neoplasia melanocítica” para neoplasias de células pigmentadas.

2.2 Melanócitos

Os melanócitos são células dendríticas localizadas principalmente na epiderme, cuja principal função é a síntese de melanina, pigmento que confere cor a certas estruturas, como à própria epiderme e pelos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). São células compostas por um citoplasma pálido e abundante, com quantidades variáveis de pigmento, núcleos grandes e pleomórficos e nucléolos proeminentes.

As células precursoras dos melanócitos são denominadas melanoblastos originários da crista neural da neurectodorme durante o desenvolvimento

embrionário. Após o fechamento do tubo neural, esses melanoblastos migram para tecidos como epiderme, derme, membranas mucosas e olhos, onde se diferenciam em melanócitos (GARMA-AVIÑA; VALLI; LUMSDEN, 1981). Quando localizados na epiderme, os melanócitos ficam alojados na camada basal próximos aos queratinócitos, os quais regulam o crescimento dos melanócitos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Para cada melanócito há cerca de cinco queratinócitos vizinhos, que estabelecem uma comunicação através dos dendritos dos melanócitos. Apesar de produzir melanina, o melanócito normal não retém melanina, ele transfere essa melanina na forma de melanossomos por meio de seus dendritos para os queratinócitos num processo denominado citocronia (HAASS et al., 2006). Cada melanócito é capaz de transportar melanina para 35 queratinócitos. O complexo formado por melanócitos e queratinócitos recebe o nome de unidade epidermal de melanina. Em situação normal, os melanócitos não formam agregados entre si, porém estabelecem ligações com queratinócitos através de moléculas de adesão como a E-caderina, desmoglina e conexinas (LI; HERLYN, 2000) (figura 1).

Figura 1. Esquema representativo da relação entre melanócitos e queratinócitos na epiderme. A comunicação se dá por meio dos dendritos dos melanócitos e por ação de ligantes como E-caderina, desmoglina e conexinas.

Fonte: Li e Herlyn (2000).

2.2.1 Produção da Melanina

Os melanócitos contêm organelas semelhantes aos lisossomos denominada melanossomos, em que a melanina é secretada e armazenada (MARKS; SEABRA, 2001) até ser transportada para os queratinócitos. A melanogênese é realizada através de um série de interações catalisadas por um complexo de enzimas (D'MELLO et al., 2016).

Existem dois tipos de melanina nos mamíferos: a eumelanina, um pigmento marrom-enegrecido, sintetizado a partir dopaquinona e eficiente contra os raios UV; e a feomelanina, pigmento amarelo-avermelhado cuja síntese depende da disponibilidade de compostos sulfidríla nos melanossomos, e associados com desenvolvimento de neoplasias cutâneas em humanos (LAMOREUX; WAKAMATSU; ITO, 2001; THODY et al., 1991).

A produção da melanina se inicia com a tirosinase, enzima cobre-dependente localizada no complexo de Golgi dos melanócitos, que catalisa a hidroxilação da L-tirosina em L-DOPA (SLOMINSKI; MOELLMANN; KUKLINSKA, 1989). A L-fenilalanina, localizada no citoplasma, pode ser convertida em tirosina devido à ação da fenilalanina hidroxilase (PAH) para servir de substrato para tirosinase (COLOMBO et al., 2011). Em seguida, a L-DOPA é convertida em dopaquinona, também catalisada pela tirosinase. A proteína relacionada a tirosinase 1 (TYRP1) e a proteína relacionada a tirosinase 2 (TYRP2) são enzimas presentes nos melanosomos que são cruciais para formação de eumelanina, tendo como principal substrato a dopaquinona. Já a formação de feomelanina depende da síntese de dopacisteína, produto da reação do dopaquinona com L-cisteína (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013).

A razão entre feomelanina e eumelanina determina a coloração da pele de mamíferos e cor de pelos (MILLINGTON, 2006). Estudos demonstram que a melanogênese é regulada principalmente pelo receptor de melanocortina 1 (MC1R), controlando quantidade e o tipo de melanina produzida (COLOMBO et al., 2011). A síntese de eumelanina é estimulada através da ação hormônios conhecidos como melanocortinas: hormônio estimulador de melanócitos α (α -MSH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), agonistas da via do MC1R. Já a feomelanina é produzida quando há ação de proteínas antagonistas de sinalização agouti (ASP), que antagoniza o α -MSH e a via do MC1R (MILLINGTON, 2006; SUZUKI et al., 1997; VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013).

2.2.2 Carcinogênese do Melanócito

Os melanócitos normais são estáveis, só proliferam em casos de regeneração ou lesão (TEIXEIRA et al., 2014). A transformação de melanócitos não-pigmentados, e que não formam aglomerados entre si, para melanócitos que retêm melanina em seu interior, e formam agrupamentos com outros melanócitos neoplásicos, depende de um processo de várias etapas: iniciação, promoção, transformação e metástase (MEIER et al., 1998).

2.2.2.1 Iniciação

Em humanos, 65% dos casos de melanomas cutâneos têm sua iniciação devido a mutações causadas por raios ultravioleta (UV), fato também observado em cabras da raça Angorá (GREEN et al., 1996; PARSONS et al., 1990). Estudos em humanos demonstraram que pacientes com xerodermia pigmentosa, doença genética no qual o organismo é incapaz de reparar o dano ao DNA causado por UVA ou UVB, têm maior risco de desenvolver neoplasias de pele, como melanomas, carcinomas de células escamosas e carcinomas de células basais (VAN STEEG; KRAEMER, 1999). Nos animais domésticos, pouco se sabe sobre a iniciação do melanoma. Predisposições raciais sugerem uma possível causa genética, provavelmente relacionada com mutações espontâneas nos melanócitos (DOBSON, 1994; GREEN et al., 1996).

A transformação de nevos benignos contribui para iniciação de uma pequena porcentagem de casos de melanomas cutâneos em humanos. Essa transformação maligna ocorre principalmente em nevos displásicos (KOH, 1991). Em animais, a transformação maligna é relatada em cavalos de pelagem tordilha, principalmente em lesões benignas na base da cauda (VALENTINE, 1995). Poucos casos relatam a transformação maligna a partir de lesões benignas em cães e, em nenhum dos casos houve formação de metástase (CONROY, 1967; MULLIGAN, 1961; VALENTINE; MCMANUS; KNOX, 1999).

2.2.2.2 Promoção

A fase de promoção depende de fatores estimuladores de proliferação celular como queimaduras, traumas crônicos, infecções, uso de certas drogas, hormônios, agentes químicos (CANELLA et al., 1996; GHAZI, 2011; TROSKO, 2001). Smith et al. (2002) sugerem que esses promotores promovem hiperplasia do epitélio, interrompendo a interação da unidade epidermal de melanina (queratinócito-melanócito), permitindo o crescimento desenfreado das células iniciadas.

2.2.2.3 Transformação

A transformação da célula normal em uma célula neoplásica ocorre principalmente pela instabilidade do DNA (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). A TP53 é uma enzima responsável pela realização do reparo de danos ao DNA e que, ao sofrer certas mutações, acarreta no desenvolvimento de neoplasias (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999). Em melanomas humanos, em cerca de 20-40% dos casos há alterações no gene *TP53* que impedem seu funcionamento adequado (WEISS et al., 1995). *RB1* é outro gene supressor de tumor, responsável pela parada do ciclo celular, impedindo a replicação constante das células neoplásicas (YAMAMOTO, 1993). Até o momento, apenas um estudo relacionou a perda da função de RB1 ao melanoma canino (PAVLIDIS et al., 1995).

À respeito do controle do ciclo celular, as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) são pequenas proteínas que se ligam à ciclina, inativando proteínas supressoras de crescimento, e permitindo a progressão do ciclo celular (PAVLETICH, 1999). Reguladores das CDKs são importantes para controlar o crescimento celular desenfreado. O *CDKN1A* (*Waf-1*) que codifica a proteína p21, uma inibidora universal das CDKs, tem como função parar o ciclo celular e impedir a apoptose, regulado pela p53 (EASTHAM et al., 1995; GARTEL; SERFAS; TYNER, 1996; MACLEOD et al., 1995). Ritt et al. (1998) demonstrou em cultura de células de melanoma canino que a CDKN1A/p21, quando localizada no núcleo, esteve associada com parada do crescimento celular, impedindo o crescimento tumoral. Isso sugere que a CDKN1A/p21 tem papel importante na inibição do crescimento de células melanocíticas (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999). Koenig et al. (2002) mostraram que, quando a CDKN1A/p21 se encontra fora do núcleo, a mesma perde função, estando relacionada com progressão do melanoma cutâneo humano.

Estudos demonstram a importância de outros inibidores de CDKs, como *INK4a* e *INK4b*, responsáveis por codificar as proteínas p16 e p15 respectivamente, regulados pelo RB1 (MODIANO; RITT; WOJCIESZYN, 1999; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Mutações que promovem a perda

de função dessas proteínas permitem a transformação neoplásica e proliferação descontrolada (RITT; WOJCIESZYN; MODIANO, 1998; TAYLOR et al., 2016).

No melanoma humano cutâneo, mutações no gene *BRAF*, principalmente V599E, estão presentes em cerca de 66% em tumores primários e 59% em cultivos celulares (DAVIES et al., 2002). B-Raf é proteína codificada pelo gene *BRAF* e está envolvida com o crescimento celular, proliferação e sinalização de sobrevivência através da via das quinases ativadoras de mitose (MAPK) (CHONG; VIKIS; GUAN, 2003; HAGEMANN; RAPP, 1999). Shelly et al. (2005) não encontraram mutações no exon 15 do *BRAF* em 17 amostras de melanomas orais caninos.

2.2.2.4 Metástase

O melanoma é uma neoplasia com grande capacidade metastática. A diminuição da expressão de E-caderina em melanomas foi demonstrada em diversos estudos, relacionada com a perda da adesão das células neoplásicas com os queratinócitos vizinhos, possibilitando a migração dessas células pela corrente sanguínea e linfática (HSU et al., 2000b; MEIER et al., 1998). A glicoproteína de adesão CD44 localizada na membrana celular interage com o ácido hialurônico para facilitar a expansão de tecidos proliferativos. Redução da expressão de CD44 foi relatada em melanomas que realizaram metástase para o linfonodo regional (RUDZKI; JOTHY, 1997; SEITER et al., 1996).

2.3 O Melanoma

2.3.1 Incidência e Importância

Os melanomas correspondem a 7% das neoplasias malignas em cães (COTCHIN, 1955). As principais áreas afetadas são cavidade oral (56%), lábios (23%), pele (11%) e dígitos (8%). Dentre as neoplasias de cavidade oral caninas, o melanoma é a neoplasia mais frequente e agressiva (DOBSON, 1994; GOLDSCHMIDT, 1985; RAMOS-VARA et al., 2000; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; TODOROFF; BRODEY, 1979). Antigamente, considerava-se

todas neoplasias melanocíticas da cavidade oral como malignas, com altas taxas de recidiva, invasão local e capacidade metastática, tendo um comportamento biológico semelhante ao melanoma oral e de mucosas humano (VAIL; MACEWEN, 2000). Podem ocorrer em qualquer região da cavidade oral, porém são mais comuns na gengiva e junções mucocutâneas (GOLDSCHMIDT, 1994). As regiões mais acometidas por metástases são os linfonodos regionais, em cerca de 70 a 90% dos casos, e pulmões (DOBSON, 1994; GOLDSCHMIDT, 1994; RAMOS-VARA et al., 2000; TODOROFF; BRODEY, 1979).

Sinais clínicos associados ao melanoma oral incluem: disfagia, devido ao espaço ocupado pela massa tumoral; ptialismo, quando há compressão tumoral de glândulas salivares; halitose, ocasionada pela necrose do tecido local; sangramento, devido a lesão de vasos que irrigam a neoplasia e formação de novos vasos; e, ocasionalmente, fraturas de mandíbula por invasão óssea de células neoplásicas (GOLDSCHMIDT, 1985; RAMOS-VARA et al., 2000). Porém, é comum a ausência de sinais clínicos em estágio iniciais da neoplasia, dificultando o diagnóstico precoce. O melanoma pode variar em sua aparência, podendo ter coloração marrom, cinza, vermelho, preto e até mesmo azul escuro (MULLIGAN, 1961). Varia também em tamanho, mas a maioria possui entre 1 a 3 cm de diâmetro no momento do diagnóstico (figura 2) (CONROY, 1967).

Figura 2. A- Nódulo enegrecido em região de palato duro com diagnóstico de melanoma oral canino. B- Metástase de melanoma oral canino em úmero de cão. C- Presença de nódulos multifocais enegrecidos em pulmão devido a metástase por melanoma oral canino. D- Fragmento de pulmão com metástase de melanoma oral canino.

Fonte: Harrington e Gould, Noah Archive, University of California - Davis.

Em equinos, cerca de 15% dos tumores de pele são melanocíticos. Apesar de 90% terem caráter benigno, diferentemente dos cães, essas neoplasias podem sofrer transformações malignas (JOHNSON, 1998; MÄHLMANN et al., 2015). A grande maioria ocorre em cavalos tordilhos, com menos de 5 anos, principalmente na região do períneo, base da cauda e genitália externa (LEVENE, 1971). É uma neoplasia rara em felinos, representando 1% de todas neoplasias de cavidade oral em gatos, sendo mais frequente nas formas cutânea e ocular (BOURGUET et al., 2015; DORN; PRIESTER, 1976; GOLDSCHMIDT, 1985; WIGGANS et al., 2016). O melanoma é importante em

suínos, principalmente nas raças Duroc e Sinclair miniatura, por estas possuírem predisposição genética e, ainda, servirem de modelo de estudo para melanomas espontâneos cutâneos em humanos (HOOK et al., 1982). Cerca de 90% dos casos de melanomas em suínos regredem espontaneamente, sendo um atrativo para estudos na área (OXENHANDLER et al., 1979; PATHAK et al., 2000). Em bovinos, as neoplasias melanocíticas correspondem a 6% de todos os tumores, ocorrendo principalmente na pele de animais vermelhos, cinzas e escuros. A variante maligna é incomum, porém há relatos de metástase nesta espécie (MILLER et al., 1995; WINSLOW et al., 2017).

O melanoma canino é um importante modelo de estudo para o melanoma humano, relacionado à sua heterogeneidade genética e morfológica, capacidade de realizar metástases espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, maior prevalência que em outras espécies e características histológicas de malignidade semelhantes aos melanomas humanos (SIMPSON et al., 2014; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; VAN DER WEYDEN et al., 2016). Grande parte dos melanomas caninos são diagnosticados em estágios avançados, já invadindo tecidos adjacentes, diferentemente dos melanomas humanos que são biopsiados em estágio iniciais, sendo pequenas massas confinadas na epiderme e derme (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Apesar disso, os melanomas humanos cutâneos apresentam características semelhantes aos melanomas caninos orais como a presença de células epitelioides, fusiformes ou a mistura dos dois tipos. Da mesma maneira que no melanoma humano, não há relação dos aspectos morfológicos da neoplasia com o prognóstico clínico do paciente em melanomas caninos. O tratamento convencional do melanoma oral canino é a excisão cirúrgica e terapia adjuvante como radioterapia e imunoterapia, semelhantemente ao tratamento preconizado em humanos (GILLARD et al., 2014; WITHROW; VAIL; PAGE, 2013).

O termo “nevo”, utilizado para descrever uma formação primariamente benigna pigmentada da epiderme e derme, não é utilizado na dermatologia veterinária (GOLDSCHMIDT, 1994). Ao contrário do melanoma humano, a radiação ultravioleta não é um fator de risco para o surgimento de melanomas orais em cães (POORMAN et al., 2015). Em aproximadamente 6% dos casos de melanomas orais canino é observada a mutação V599E em *BRAF*, semelhante

ao que ocorre em humanos (MOCHIZUKI et al., 2015). Mutações em *NRAS*, *PTEN* e *c-KIT* foram relatadas tanto em melanomas orais de cães e melanomas cutâneos de humanos (GILLARD et al., 2014).

Uma parceria entre Estados Unidos e Canadá, do Instituto Nacional de Câncer, criou um centro de estudos pré-clínicos em cães para drogas humanas chamada de Consórcio de Ensaios Oncológicos Comparativos - *Comparative Oncology Trials Consortium* (GORDON et al., 2009; KHANNA et al., 2009). Nesse grupo, se aplicam um delineamento de ensaios clínicos, onde pacientes humanos e caninos, com a mesma neoplasia, ou mutação, são submetidos ao mesmo tratamento (KHANNA et al., 2009). Como o cão apresenta um tempo de vida menor que o humano, esse tipo de ensaio promove um caráter preditivo ao estudo, relacionado aos efeitos a longo prazo, progressão da doença e tempo de sobrevida (GORDON et al., 2009; PAOLONI; KHANNA, 2008).

2.3.2 Predisposição Racial, Sexual e Etária

Os melanomas orais são mais comuns em cães com mais de 10 anos de idade, porém podem ocorrer em animais mais jovens, variando de 1 a 17 anos (RAMOS-VARA et al., 2000). No estudo de Spangler e Kass (2006), foi descrita maior frequência em animais acima de 12 anos de idade.

Uma maior frequência em machos foi descrita em trabalhos antigos (DOBSON, 1994; DORN; PRIESTER, 1976; TODOROFF; BRODEY, 1979), semelhantemente ao que ocorre em humanos, 2,3:1 (BARKER et al., 1997; ROGERS; GIBSON, 1997), porém, essa proporção não se manteve, estando possivelmente relacionada com mudanças no delineamento experimental e/ou mudanças nos hábitos de vida de cães (BERGMAN, 2007; RAMOS-VARA et al., 2000; SMEDLEY et al., 2011a; SPANGLER; KASS, 2006).

Ainda não é claro o motivo da predisposição racial, provavelmente está relacionado com risco genético e/ou nível de pigmentação. Pastor alemão e Boxer são as raças com maior predisposição a desenvolver melanoma oral (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; TODOROFF; BRODEY, 1979). Em melanomas de lábios, as raças mais predispostas são Cocker Spaniel,

Golden Retriever e Chihuahua (DOBSON, 1994). Já o melanoma cutâneo é mais frequente em Schnauzer e Scottish Terrier (CONROY, 1967; DOBSON, 1994; GOLDSCHMIDT, 1985).

2.3.3 Aparência Macroscópica

A aparência macroscópica do melanoma pode ser bastante variável em tamanho, coloração, presença de ulceração, necrose e alopecia (TUOHY et al., 2014). Normalmente são infiltrativos, não-encapsulados e, apesar de ser originário de células pigmentadas, podem se apresentar com as mais diferentes colorações, variando do cinza, enegrecido, marrom, vermelho e azul-escuro (GOLDSCHMIDT; HENDRICK, 2008; JACOBS; MESSICK; VALLI, 2008; MELEO, 1997). Ademais, a pigmentação da neoplasia não é uma característica específica do melanoma, frequentemente encontrada em melanocitomas, hiperplasia melanocítica, máculas hiperpigmentadas, hamartomas epidermais, queratose seborreica canina, nevus epidermais e hemangiomas ou hemangiossarcomas dérmicos (GOLDSCHMIDT, 1985; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Possuem tamanho variado, sendo que a maioria se apresente entre 1-3 cm de diâmetro (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estadia o melanoma canino baseado no tamanho da neoplasia: tumores menores que 2,0 cm, estágio I; tumores entre 2,0 e 4,0 cm, estágio II; tumores maiores que 4,0 cm e/ou com metástase em linfonodo regional, estágio III; e tumores com metástases distantes, estágio IV. O estadiamento clínico proposto pela OMS é considerado um parâmetro prognóstico para o melanoma oral canino (BERGMAN, 2007).

Os achados necroscópicos dependem da progressão do melanoma no momento do exame. Devido a sua grande capacidade de formar metástase, tanto por via hematogena quanto linfática, foram relatadas metástase em diversas localizações, com destaque para os linfonodos, pulmões, pericárdio, pleura e peritônio (BABA; CÂTOI, 2007; BERTOY; BRIGHTMAN; REGAN, 1988; KUNZE et al., 1986; MINAMI; PATNAIK, 1992; PATNAIK; MOONEY, 1988; RODRÍGUEZ et al., 1998). Seu caráter infiltrativo é caracterizado por casos

frequentes em que ocorre lise óssea de dígitos, maxila, mandíbula, vértebras e costelas (MARINO et al., 1995; PATNAIK; MOONEY, 1988; RODRÍGUEZ et al., 1998).

2.3.4 Diagnóstico

2.3.4.1 Citologia

Antes de se determinar um tratamento para neoplasias da cavidade oral são necessários exames complementares para um diagnóstico adequado como radiografia, citologia e biopsia. Um diagnóstico preciso pré-cirúrgico é essencial para determinar o tratamento adequado e estimar os custos da terapia. Em vista disso, a citopatologia pode fornecer informações importantes, com melhor relação custo-benefício, além de fácil e rápida realização (RASKIN; MEYER, 2001). As desvantagens do exame citopatológico estão relacionadas a resultados inconclusivos, algumas vezes necessitando de outros meios de diagnóstico (PRZEŹDZIECKI; CZOPOWICZ; SAPIERZYŃSKI, 2015).

Este mesmo exame é importante para detecção de metástases em linfonodos regionais. Um estudo veterinário demonstrou que a punção aspirativa com agulha fina do linfonodo regional teve 100% de especificidade e sensibilidade para detecção de metástases (LANGENBACH et al., 2001). Diversos estudos em humanos demonstram uma alta sensibilidade e especificidade da FNAC para detecção de metástases em linfonodos regionais (CHENG; KUO; CHEN, 2013; HALL et al., 2013; KAWAHARA et al., 2013; VASILJ; KATOVIĆ, 2015).

Os melanomas podem ser divididos quanto ao tipo celular em epitelioides, de células fusiformes ou a mistura dos dois tipos (RASKIN; MEYER, 2001). De modo geral, neoplasias melanocíticas bem diferenciadas apresentam células individualizadas, com o núcleo pequeno central a excêntrico, redondo a oval, cromatina moderadamente densa a fina, nucléolo evidente redondo a oval e com grânulos marrom-enegrecidos intracitoplasmáticos (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002) (Figura 3A). Os melanomas pouco diferenciados são definidos por apresentarem comum nucléolos gigantes, intenso pleomorfismo,

grande variação na relação núcleo:citoplasma, e quantidades variáveis de grânulos enegrecidos e células multinucleadas (SHELLY, 2003) (Figura 3B).

O número de grânulos de melanina pode variar, com regiões profundas apresentando células fusiformes e poucos grânulos, e áreas superficiais compostas por células epitelioides com grande quantidade de melanina (RASKIN; MEYER, 2001). Em melanomas amelanóticos, uma “poeira cinza” pode ser encontrada em algumas células que auxiliam no diagnóstico de neoplasia melanocítica (Figura 3C) (RASKIN; MEYER, 2001). Uma variante rara “balonosa” de melanomas foi relatada em animais, que se confunde com outras neoplasias como carcinoma sebáceo e lipossarcoma, dificultando o diagnóstico (WILKERSON et al., 2003) (Figura 3D).

Figura 3. Aspectos morfológicos do exame citológico das neoplasias melanocíticas. A- Melanocitoma em cão – presença de células isoladas epitelioides (seta escura) ou alongadas (seta clara) sem nucléolos evidentes, cromatina densa e grande quantidade de melanina no citoplasma. B- Melanoma amelanótico em cão – células com elevado grau de pleomorfismo, variada proporção núcleo:citoplasma, nucléolos evidentes, sem presença de melanina visível. C- Melanoma amelanótico em cão – “poeira cinza” importante para diagnóstico em melanomas amelanóticos. D- Melanoma balonoso em cão – citocentrifugado com diversas células vacuolizadas. Coloração de Wright, objetiva 10x.

Fonte: Raskin e Meyer, 2001; Wilkerson et al. 2003

Os diagnósticos diferenciais do melanoma amelanótico são neoplasias de células redondas, sarcomas e carcinomas indiferenciados. Diferentemente de outras neoplasias da cavidade oral, o melanoma provoca pouca inflamação aguda, sendo mais frequente uma resposta crônica com presença de macrófagos contendo melanina, denominados melanófagos. Em casos de

metástases distantes é possível encontrar os melanófagos nas correntes sanguínea e linfática (TARRANT et al., 2010).

2.3.4.2 Histopatologia

A histopatologia é o padrão-ouro para o diagnóstico de melanoma. Melanócitos neoplásicos são encontrados isolados ou em pequenos ninhos na porção basal ou nas camadas superiores da epiderme, denominada infiltração pagetóide. As células apresentam núcleo grande e nucléolo evidente e as figuras de mitose são frequentes (MEUTEN; HEAD, KW; ELSE, RW; DUBIELZIG, 2002). A formação de ninhos intraepidermais é importante para determinar o diagnóstico de melanoma quando células neoplásicas não são encontradas na derme (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002).

Normalmente, os melanócitos neoplásicos encontrados na derme são anaplásicos e pleomórficos, adquirindo formato epitelióide ou fusiforme (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). A variante epitelióide contém células arredondadas, discretos limites celulares, grande citoplasma claro e forma ninhos separados por um estroma fibrovascular. Podem apresentar invasão pagetóide nos componentes de mucosa e submucosa adjacente. Já a variante fusiforme apresenta células com núcleo maiores e nucléolos mais evidentes, um padrão entrelaçado semelhante ao observado em fibrossarcomas ou padrão “em redemoinhos”, semelhante a tumores de bainha de nervo periférico e hemangiopericitomas. É possível encontrar metaplasia condroide ou óssea. Uma forma de melanoma pouco encontrada é a variante balonosa que possui citoplasma eosinofílico pálido com pequena quantidade de grânulos de melanina, núcleo redondo, anisocariose em intensidade variável, nucléolo proeminente e cromatina proeminente (MEUTEN; HEAD, KW; ELSE, RW; DUBIELZIG, 2002).

Um achado importante para confirmar o diagnóstico de melanoma é a presença de grânulos de melanina no interior das células neoplásicas, importante para diferenciar de outras neoplasias mesenquimais.

2.3.4.3 Histoquímica

Colorações histoquímicas para diagnóstico de melanoma são baseadas em reações de redução da prata em soluções amoniacaais. A técnica mais utilizada na rotina é a coloração de prata Fontana-Masson (SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). A melanina serve de fator de redução para a prata. A principal desvantagem dessa técnica são outros pigmentos que podem comprometer o diagnóstico, como lipofuscina (BERRINGTON; JIMBOW; HAINES, 1994).

2.3.4.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é o principal exame utilizado em casos de melanomas amelanóticos. Desde a criação da técnica, diversos marcadores já foram utilizados, sendo os mais utilizados na rotina: HMB-45, Melan A, Tirosinase e os coquetéis contendo mais de um marcador.

2.3.4.4.1 HMB-45

É um anticorpo monoclonal criado para ser contra linhagem de células de melanomas pigmentados Mel-1, derivado de um linfonodo com metástase (GOWN et al., 1986). Tem esse nome devido suas características imunogênicas: “melanoma humano preto”. Este anticorpo reconhece uma proteína de membrana melanossomal chamada de PMEL17, importante para a organização estrutural dos melanossomos (THEOS et al., 2005). É altamente expresso em lesões melanocíticas nas porções superiores da epiderme e derme superficial, porém não apresenta marcação quando as lesões são altamente invasivas, acometendo derme profunda (PRIETO; SHEA, 2011). A marcação de HMB-45 é mais evidenciada em melanomas epitelioides (SUNDRAM et al., 2003).

A especificidade em melanomas primários é de 73 a 100%. Porém, quando avaliada em linfonodos metastáticos, cai para 58 a 95% (ORCHARD, 2000; ROCHAIX et al., 2003; SHAH; GANI; WHEELER, 1997). Uma revisão de literatura avaliando 866 melanomas mostrou que 83% apresentavam marcação

para HMB-45 (GOWN et al., 1986; MIETTINEN et al., 2001; ORCHARD, 2000; PLAZA; SUSTER; PEREZ-MONTIEL, 2007; ROCHAIX et al., 2003; SHAH; GANI; WHEELER, 1997; THEOS et al., 2005). A expressão de HMB-45 pode ocorrer em outras neoplasias como alguns sarcomas, tumores epitelioides perivasculares, tumores de células ovarianas, schwannomas melanóticos e carcinomas renais (EL-NAGGAR et al., 1991; FOLPE et al., 2005; MENTZEL et al., 2005; TAZELAAR; BATTS; SRIGLEY, 2001; VANG; KEMPSON, 2002).

2.3.4.4.2 Melan-A

Também conhecido como MART-1, é o antígeno associado ao melanoma reconhecido por linfócitos T citotóxicos (CHEN et al., 1996). Em 1994, o gene que o codifica foi clonado em uma linhagem de células de melanoma humano e chamado de Melan-A, pois acreditava-se ser o antígeno de melanócitos (COULIE et al., 1994). No mesmo período, outro grupo usando linhagem celular diferente obteve o mesmo antígeno e denominou MART-1 (KAWAKAMI et al., 1994). O Melan-A é uma proteína transmembrana que está expressa em melanócitos da pele e da retina. Está presente principalmente em melanossomos e no retículo endoplasmático e tem papel importante de regular a proteína PMEL17 (KAWAKAMI et al., 1997).

Estudos demonstram expressão de Melan-A em todos os tipos de melanomas, inclusive em linfonodos metastáticos. A especificidade diagnóstica do Melan-A é de 85 a 97% em melanomas primários e 57 a 92% em melanomas metastáticos (FETSCH et al., 1999; KAUFMANN et al., 1998a; ROCHAIX et al., 2003; SUNDRAM et al., 2003). Um trabalho de revisão com 1183 casos demonstrou que 86% apresentavam expressão de Melan-A (CLARKSON; STURDGE; MOLYNEUX, 2001; GRANTER et al., 2002; KAUFMANN et al., 1998a; KAY et al., 2004; MIETTINEN; FRANSILA, 1989; ORCHARD, 2002; ROCHAIX et al., 2003; SUNDRAM et al., 2003; WINNEPENNINCKX et al., 2003). Por ser altamente sensível, é bastante utilizado para pesquisas de micrometástases em linfonodos sentinelas. Possui vantagem com relação ao S100 na pesquisa de metástases linfáticas por não ser expresso em células

dendríticas dos linfonodos e com relação ao HMB-45 por ser mais sensível (ZUBOVITS et al., 2004).

2.3.4.4.3 Tirosinase

É a principal enzima necessária para a síntese de melanina, sendo encontrada nos melanossomos (KÖRNER; PAWELEK, 1982). Está expressa em epitélios pigmentados como retina, íris e cílios e em melanócitos da epiderme, sendo mais expressa nas células superficiais. Apresenta maior expressão em melanomas epitelioides (JUNGBLUTH et al., 2000), com 90% dos casos de melanoma primário positivos, e entre 63 a 92% dos metastáticos (FETSCH et al., 2000; HOFBAUER et al., 1998; JUNGBLUTH et al., 2000). Um artigo de revisão avaliou 780 casos de melanoma, sendo que 81% foram positivos para tirosinase. Apesar disso, a tirosinase também é expressa em alguns sarcomas e neurofibromas pigmentados (BUSAM et al., 2005; FETSCH et al., 2000; GRANTER et al., 2002; HOFBAUER et al., 1998; KAUFMANN et al., 1998b; MIETTINEN; FRANSSILA, 1989; ORCHARD, 2000; REINKE et al., 2005; ROCHAIX et al., 2003).

2.3.4.4.4 Coquetéis

Os coquetéis marcadores de melanoma são reagentes que unem 2 ou mais anticorpos monoclonais. São utilizados para ampliar os níveis de sensibilidade do diagnóstico, sendo importantes em casos de melanomas pouco diferenciados, detecção de micrometástases em linfonodos, confirmação de metástases em casos de pacientes com histórico de melanomas (ORDÓÑEZ, 2014).

2.3.5 Prognóstico

Marcadores prognósticos e preditivos são cada vez mais alvos de pesquisa em medicina veterinária. Com o aumento das opções de tratamento, os tutores exigem toda informação possível, como custo, potenciais efeitos

deletérios e impactos emocionais para a família (WEBSTER et al., 2011). Uma extensa revisão realizada por Smedley et al. (2011), avaliou minuciosamente os possíveis marcadores prognósticos para o melanoma canino e determinou recomendações prognósticas nesta neoplasia.

2.3.5.1 Metástases e Invasão Linfática

Apesar de poucos estudos a avaliarem de maneira adequada, a presença de metástase distantes tem relação com o prognóstico do paciente. O estudo de Proulx et al. (2003) mostrou que o tamanho da neoplasia estava relacionado com o pior prognóstico do paciente, justificando que uma maior neoplasia tinha células mais heterogêneas e maior chances de realizar metástase para regiões distantes, como pulmões. Já Hahn et al. (1994) mostrou que ausência de metástases distantes no momento da cirurgia estava relacionada com aumento da sobrevida e intervalo livre de doença.

Estudos relacionando a presença de metástases em linfonodos regionais com o intervalo livre de doença e tempo de sobrevida, não obtiveram diferenças significativas (HAHN et al., 1994; PROULX; RUSLANDER; HAUCK, 2003). Smedley et al. (2011) destacam que em ambos estudos apenas neoplasias malignas na histologia foram incluídas, não havendo efeito de comparação com uma população de referência.

2.3.5.2 Localização da Neoplasia

Historicamente se considerou que neoplasias melanocíticas da cavidade oral e lábios eram malignas e as neoplasias cutâneas eram consideradas benignas. Porém há alguns anos, tem-se demonstrado que algumas neoplasias melanocíticas da cavidade oral e lábios tinham um prognóstico favorável. Tumores pigmentados da cavidade oral e lábios com presença de melanócitos bem diferenciados e baixa taxa mitótica tiveram um bom prognóstico. No estudo de Spangler e Kass (2011), 92% das neoplasias melanocíticas de boca eram malignas, porém apenas em 59% houve formação de metástases e recidiva. Neoplasias melanocíticas de lábios demonstraram uma sobrevida de pelo menos

1 ano em 90% dos casos, porém não foi avaliada a origem dessas neoplasias, se de mucosas ou pele (ESPLIN, 2008).

Nas neoplasias melanocíticas cutâneas, as localizadas em dígitos apresentam um pior prognóstico que as demais, com 56% dos animais com sobrevida superior a 2 anos, enquanto para outras neoplasias melanocíticas cutâneas houve uma taxa de 83,8% (SPANGLER; KASS, 2006). Neste mesmo estudo, 74% das neoplasias melanocíticas dos dígitos e lábios eram consideradas malignas, mas apenas 38% demonstraram um comportamento agressivo. Sugere-se utilizar fatores prognósticos adicionais ao se tratar de neoplasias melanocíticas cutâneas devido ao seu baixo valor preditivo positivo em relação ao prognóstico (SPANGLER; KASS, 2006).

Portanto, podemos concluir que neoplasias melanocíticas da cavidade oral e lábios, na maioria das vezes, apresentam um pior prognóstico e comportamento agressivo, enquanto neoplasias melanocíticas cutâneas, excluindo as que ocorrem nos dígitos, apresentam um prognóstico favorável e comportamento menos agressivo. A grande dificuldade dos clínicos e patologistas é determinar as neoplasias orais com caráter benigno e as neoplasias cutâneas de caráter malignos (SMEDLEY et al., 2011a).

2.3.5.3 Atipia Nuclear

A atipia nuclear indica o grau relativo de maturação celular e é avaliado apenas em neoplasias epitelioides (SPANGLER; KASS, 2006). Por ser um parâmetro subjetivo com variações interobservadores, critérios bem definidos e específicos devem ser utilizados para avaliar a atipia nuclear (SMEDLEY et al., 2011a). Melanócitos neoplásicos bem diferenciados possuem um pequeno núcleo com um único nucléolo, central e com cromatina fina e dispersa. Por vezes, formam finos cordões que se estendem do nucléolo à membrana nuclear com condensação da cromatina (figura 4A). Melanócitos neoplásicos pouco diferenciados apresentam nucléolo grande, excêntrico, por vezes múltiplos, sendo conectados por um cordão que se liga a superfície do núcleo dando a impressão de vacúolos coalescentes (figura 4B).

Figura 4. Neoplasia melanocítica canina. A- Melanócitos bem diferenciados com núcleos pequenos, nucléolos centrais, cromatina dispersa e fino cordão se estendendo do nucléolo à membrana nuclear (seta). Pequena variação de tamanho e formato dos melanócitos, H&E, 40X. B- Melanócitos pouco diferenciados com múltiplos nucléolos, anisocariose proeminente, pleomorfismo (seta vertical) e um melanócito típico com nucléolo único e central (seta horizontal), H&E, 40X.

Fonte: Spangler e Kass (2006)

Segundo Spangler e Kass (2006), a avaliação da atipia nuclear é utilizada para melanomas epitelioides, não aplicável aos melanomas de células fusiformes ou balonosas. A atipia nuclear foi avaliada em uma escala de 1 a 10, de acordo com a porcentagem estimada de células que apresentam núcleos atípicos em 100 células de melanomas orais, cutâneos e de dígitos, resultando em um ponto de corte $\geq 40\%$ para pior prognóstico (SPANGLER; KASS, 2006). Bergin et al. (2011) utilizou o mesmo critério avaliando 200 células em neoplasias de cavidade oral e lábios, obtendo um valor de corte de $\geq 30\%$. Essa diferença provavelmente está relacionada com a variação interobservador (SMEDLEY et al., 2011a).

Para melanomas da cavidade oral, a atipia nuclear de score >5 demonstrou com relação ao prognóstico uma sensibilidade de 92,5%, especificidade de 81,3%, valor preditivo positivo de 92,5%, valor preditivo negativo de 81,3 (SPANGLER; KASS, 2006). A avaliação da atipia nuclear se demonstra trabalhosa, com variação interobservadores, sendo difícil de ser aplicada na rotina (SMEDLEY et al., 2011a). Outros três estudos não mostraram relação entre a atipia nuclear com o comportamento neoplásico em neoplasias melanocíticas orais e cutâneas, possivelmente relacionada com pouco número de casos, poucos casos com prognóstico favorável e menos critérios para atipia (MILLANTA et al., 2002; SÁNCHEZ et al., 2007; SCHULTHEISS, 2006).

2.3.5.4 Índice Mitótico

O índice mitótico é uma das ferramentas prognósticas mais avaliadas na literatura, inclusive em neoplasias melanocíticas. Bergin et al. (2011) a estabeleceram como fator prognóstico para neoplasias melanocíticas em pele, cavidade oral e lábios, apesar de não parecer tão relevante quanto a atipia nuclear e a marcação de Ki67.

Diversos trabalhos determinam o índice mitótico através da contagem média de mitoses em 10 campos de grande aumento (*high-power fields*, HPF) consecutivos não sobrepostos com foco em áreas de alta atividade mitótica (BERGIN et al., 2011; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; SPANGLER; KASS, 2006). Com esse método, neoplasias melanocíticas de cavidade oral e lábios com >4 mitoses em média por HPF foram associados com o risco de morte do paciente em menos de 1 ano, apresentando sensibilidade de 90% e especificidade de 84%. Esplin (2008) avaliou 69 casos de neoplasias melanocíticas bem diferenciadas com prognóstico favorável, e demonstrou que nenhum dos casos apresentou >3 mitoses por HPF. Hahn et al. (1994) avaliaram o índice mitótico por meio da contagem de mitoses em 20 HPF escolhidos aleatoriamente em melanomas orais. As neoplasias foram divididas em dois grupos: >3 mitoses e <3 mitoses em média em um único HPF. Os 12 animais do grupo <3 tiveram maior tempo de remissão e sobrevida do que o outro grupo.

O índice mitótico se mostrou preditivo do comportamento maligno de neoplasias melanocíticas em alguns estudos (BERGIN et al., 2011; MILLANTA et al., 2002; SPANGLER; KASS, 2006), e sem relação com a sobrevida em outros trabalhos (BOSTOCK, 1973; HARVEY et al., 1981; RAMOS-VARA et al., 2000; SCHULTHEISS, 2006). Apesar disso, não é possível determinar com 100% de segurança o desfecho de determinada neoplasia. Ao se combinar os resultados de índice mitótico com atipia nuclear, é possível estabelecer um modelo com mais informações preditivas e chegar mais próximo do desfecho do paciente (BERGIN et al., 2011).

2.3.5.5 Grau de Pigmentação

Da mesma maneira que é difícil se realizar o diagnóstico de melanomas amelanóticos, a mensuração da quantidade de pigmentos de melanina para avaliação prognóstica é igualmente difícil. De maneira semiquantitativa, há diversos relatos na literatura estabelecendo tumores com “alta” e “baixa” quantidade de melanina, apesar de nenhum demonstrar critérios para inclusão nos grupos (SMEDLEY et al., 2011b).

Esplin (2008) estudou neoplasias de cavidade oral e lábios bem diferenciadas e altamente pigmentadas, obtendo 95% de cães vivos ou que morreram por outras causas ao final do estudo. Da mesma maneira, Bergin et al. (2011) mostrou que neoplasias da cavidade oral e lábios com grande quantidade de pigmento tiveram maior sobrevida que os outros grupos, a saber: pouca e moderada quantidades de pigmento, ou amelanóticos. Apesar disso, Smedley et al. (2011a) não verificaram relação do grau de pigmentação com o prognóstico.

2.3.5.6 Ki67

A proteína Ki67 está expressa no núcleo de células nas fases ativas do ciclo celular (G1-M). A taxa de Ki67 é considerada a fração de crescimento tumoral (BERGIN et al., 2011) e é diferente entre neoplasias melanocíticas benignas e malignas, correlacionando-se com a sobrevida dos animais

(SMEDLEY et al., 2011a). Bergin et al. (2011) obtiveram maior marcação de Ki67 em melanomas orais de pacientes que vieram a óbito no período de até 1 ano após cirurgia quando comparados aos animais que sobreviveram por mais que 1 ano. Neste trabalho, avaliou-se Ki67 por meio da contagem de núcleos positivos em 5 áreas de 1mm² com auxílio de uma grátula e à objetiva de 40x. O valor de corte foi de 19,5 células positivas/mm², com sensibilidade de 87,1% e especificidade de 85,7%. Pela análise de sobrevida de Kaplan-Meier, houve diferenças significativas entre os grupos, além de correlação positiva com índice mitótico e atipia nuclear, e negativa com grau de pigmentação (BERGIN et al., 2011).

Com relação as neoplasias melanocíticas cutâneas, Laprie et al. (2001) utilizaram o mesmo método de Bergin et al. (2011) para determinar o índice de Ki67 em 68 neoplasias melanocíticas cutâneas, contados em 500 células. Estabeleceram um novo valor de corte, de 15%, que apresentou resultado estatístico significativo com relação a sobrevida dos pacientes, mostrando uma classificação preditiva de 97%, superior ao índice mitótico e características histopatológicas. Houve correlação na expressão de Ki67 com índice mitótico. Até o momento, as técnicas de Bergin et al. (2011) e Laprie et al. (2001) são preconizadas para contagem de índice Ki67 em melanomas. Outros estudos realizaram algumas adaptações como maior número de células contadas (SÁNCHEZ et al., 2007) e contagem por *software* de análise de imagens (MILLANTA et al., 2002; ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 1999), porém chegando às mesmas conclusões.

Além de sua função como ferramenta prognóstica, o índice de Ki67 é importante para o diagnóstico de casos que apresentam comportamento benigno, porém com características histológicas de malignidade. Spangler e Kass (2006) identificaram um subtipo de neoplasias cutâneas que foram classificadas como benignas na histopatologia, mas apresentavam comportamento maligno, e um subtipo de neoplasia de lábio com comportamento benigno e características histológicas agressivas.

O índice de Ki67 é mais objetivo e menos influenciado pela variação interobservador quando comparado à atipia nuclear e índice mitótico, porém sugere-se ser avaliado em estudo prospectivo com comparação direta de

resultados entre observadores (SMEDLEY et al., 2011a). Os estudos prognósticos encontrados na literatura são retrospectivos, com critérios de inclusão e exclusão nebulosos, necropsias são raramente realizadas, sendo claro a necessidade de mais estudos na área a fim de se aproximar ao máximo do prognóstico do paciente (SMEDLEY et al., 2011a).

2.3.6 Tratamento

A escolha do tratamento é determinada pelo estadiamento clínico, natureza histológica e agressividade neoplásica (VERSTRAETE, 2005). Em casos que não há metástase distante, a cirurgia local com amplas margens é mais efetiva para erradicar a neoplasia. Em casos de neoplasia com comportamento agressivo, capacidade de recidiva e formação de metástases, a cirurgia pode não ser capaz de remover todo o tumor, sendo necessárias terapias adjuvantes como quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (BERGMAN, 2007).

2.3.6.1 Cirurgia

A maxilectomia ou mandibulectomia são preconizadas no tratamento de neoplasias da cavidade oral. Apesar de serem procedimentos cruentos, são bem tolerados pela maioria dos cães, necessitando de pouco equipamento especializado e levando a poucas complicações pós-cirúrgicas (WALLACE; MATTHIESEN; PATNAIK, 1992). É importante determinar o objetivo da cirurgia em cada caso, que na maioria das vezes será a cura do paciente. Nesses casos é necessária excisão adequada com margens livres de tumor e ausência de metástases. Se a progressão da doença não permite a excisão total da neoplasia, a cirurgia pode ser realizada com fins paliativos, frequente em melanomas orais. Nesses casos o objetivo é promover qualidade de vida ao paciente e controle local da neoplasia (VERSTRAETE, 2005).

No estudo de Tuohy et al. (2014), cães que tiveram cirurgia como tratamento único tiveram maiores tempos livre de progressão e de sobrevida, principalmente porque, na maioria dos casos, a cirurgia tinha objetivo da cura do

paciente. Nesse mesmo estudo, notaram que o tempo de sobrevida em casos com terapias adjuvantes era menor, possivelmente devido ao comportamento agressivo das neoplasias que necessitam desse tipo de tratamento ou relacionado com efeitos adversos da quimioterapia, que podem acelerar o óbito dos pacientes. Da mesma maneira, um estudo com neoplasias de língua demonstrou maior sobrevida em casos tratados exclusivamente com cirurgia, quando comparados com tumores mais agressivos que dependem de terapias adjuvantes (CULP et al., 2013).

2.3.6.2 Radioterapia

A radioterapia é o método mais utilizado em associação à cirurgia para controle local de tumores orais. O uso da radioterapia demonstra uma sobrevida de cerca de 7 meses ao ser associada com o excisão cirúrgica (BATEMAN et al., 1994; PROULX; RUSLANDER; HAUCK, 2003). Dessa forma, a cirurgia é preconizada no tratamento local da neoplasia oral, sendo indicada radioterapia em casos de excisão incompleta ou local de difícil acesso, além de possíveis complicações de deglutição ou motivos estéticos (FOX et al., 1997). Em humanos, os melanomas cutâneos são considerados radorresistentes (DEWEY, D., 1971). O estudo de Dank et al. (2014) demonstraram que cães tratados com radioterapia tiveram menores taxas de recidiva que pacientes não tratados.

As diferenças nos protocolos radioterápicos dificultam a comparação de resultados entre os diferentes estudos (KAWABE et al., 2015). Bateman et al. (1994) demonstram que melanomas expostos a frações maiores de raio obtêm melhores resultados de controle local que os protocolos hipofracionados, porém não há diferença estatística na sobrevida total dos pacientes. Pacientes submetidos à ortovoltagem de raios-X (OVX), que acomete estruturas semi-profundas, tiveram uma sobrevida menor que os animais do grupo de megavoltagem de raios-X (MVX), capaz de atingir regiões mais profundas (KAWABE et al., 2015).

O Grupo de Terapia Radiológica Oncológica Veterinária dos Estados Unidos e a Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer, padronizaram uma classificação dos sinais adversos e tóxicos da radioterapia

em animais (LADUE; KLEIN, 2001). Os sinais variam entre scores de 0 a 3 em tecidos como pele, cavidade oral, olhos, pavilhão auricular, trato gastrointestinal, genitourinário, sistema nervoso central e pulmões. Kawabe et al. (2015) demonstraram que radioterapias MVX apresentavam mais danos agudos por radiação que o tratamento com OVX, principalmente nos olhos. Bateman et al. (1994) obtiveram reações agudas de baixo escore e limitadas à pele e aos dentes, mesmo utilizando protocolo altas frações de raios-X.

2.3.6.3 Quimioterapia

Em humanos, a literatura sugere que o melanoma é um tumor extremamente quimiorresistente (MURPHY et al., 2005), porém há demanda por tratamentos sistêmicos em casos de metástases e neoplasias invasivas (BROCKLEY; COOPER; BENNETT, 2013). Os resultados de estudos que avaliam a eficácia de quimioterápicos no tratamento do melanoma oral canino ainda são inconsistentes e ambíguos (BERGMAN, 2007).

Proulx et al. (2003) trataram melanomas orais de 140 cães com radioterapia associada ou não à carboplatina, não havendo diferenças significativas entre os dois grupos. Porém, a dose de carboplatina usada foi abaixo do recomendado neste estudo. Em outro estudo avaliando a eficiência da carboplatina no tratamento do melanoma oral de cães, não houve benefícios na associação desse quimioterápico com a radioterapia (MURPHY et al., 2005). De modo contrário, um trabalho com 27 melanomas caninos demonstrou que o uso da carboplatina foi eficiente para redução do tamanho das neoplasias (RASSNICK et al., 2001). No estudo de Boston et al. (2014) não houve diferença estatística da sobrevida de animais tratados apenas com cirurgia e pacientes com quimioterapia associada. Em camundongos, o uso de baixa dose de ciclofosfamida associada ao piroxicam foi capaz de diminuir a neovascularização do melanoma oral maligno, relacionado com inibição de fatores pró-angiogênicos, sendo necessária validação em cães (CHOISUNIRACHON et al., 2015).

A eletroquimioterapia (ECT) é um método de tratamento que associa a administração de quimioterápicos com pulsos elétricos controlados para facilitar

a entrada dos fármacos nas células cancerosas (DASKALOV; MUDROV; PEYCHEVA, 1999). Um estudo com ECT demonstrou que o tratamento obteve redução local em 70% dos casos e sem sinais deletérios, porém não apresentou diferença significativa na média de sobrevida dos animais. Por ser um estudo com apenas 10 cães, os resultados devem ser validados em populações maiores (SPUGNINI et al., 2006).

2.3.6.4 Imunoterapia

A imunoterapia se baseia na utilização da resposta imune do indivíduo, seja inata ou adaptativa, para combater o desenvolvimento das neoplasias (VESELY et al., 2011). A resistência à resposta imune é um dos *hallmarks* do câncer (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011). Os melanomas surgem em pacientes imunocompetentes e, dessa forma, as células neoplásicas são submetidas a uma imunosseleção que permite a progressão tumoral em um indivíduo imunocompetente (SHANKARAN et al., 2001). Em vista disso, diversos trabalhos avaliam a resposta imune em casos de melanoma para compreender como ocorre a evasão das células neoplásicas, buscando alvos para a imunoterapia.

Cães tratados com injeção intravenosa de *Corynebacterium parvum* inativo em estadiamento clínico II ou III do melanoma tiveram sobrevida estatisticamente maior que cães tratados apenas com cirurgia (MACEWEN et al., 1986). Em um ensaio pré-clínico, Thamm et al. (2010) obtiveram evidências de que cães tratados com fator de necrose tumoral α (TNF α) carregado por polietilenoglicol (PEG) tiveram atividade antitumoral com redução do tamanho das neoplasias, além de não apresentar efeitos tóxicos das doses preconizadas. O aumento da expressão do ligante de Fas (FasL) induziu apoptose dos melanócitos cancerosos em todos os animais tratados e não apresentou efeitos adversos em nenhum dos casos, com redução na massa tumoral em 80% dos casos (BIANCO et al., 2003).

Von Euler et al. (2008) estudaram a ação de um vetor ligante de CD40, responsável por estimular células dendríticas e células T, em dois casos de melanoma canino. Houve baixa toxicidade e fácil administração do adenovírus que resultaram em efeito antitumoral. O mesmo grupo deu continuidade a

pesquisa realizando um ensaio de fase I/II para tratamento de melanomas caninos, obtendo remissão total ou parcial da lesão em 6 casos e infiltração de linfócitos T e B no tumor (WESTBERG et al., 2013).

Bergman et al. (2003) mostraram que a terapia com tirosinase xenogênica causa pequenas pápulas locais, mas sem efeitos adversos sistêmicos, tendo como resultado a remissão de um caso de metástase pulmonar e quatro outros casos com aumento da sobrevida. O mesmo grupo avaliou a vacinação com DNA xenogênico codificador de tirosinase em cães com melanoma e obteve formação de anticorpos específicos anti-tirosinase e potencial terapêutico para melanomas grau II e III, sem presença de efeitos adversos (BERGMAN et al., 2006).

2.3.6.5 Vacina

A descoberta de antígenos associados ao tumor (TAAs) permitiu o desenvolvimento de técnicas para alvos específicos de neoplasias, como a tirosinase em melanomas (BUONAGURO et al., 2011). Em 2006, Milner et al. mostraram que um TAA de membrana de células de melanoma canino foi aplicado com adjuvantes de CpG e RIBI em cães saudáveis que desenvolveram resposta humoral e citotóxica (MILNER et al., 2006). Existem diversas estratégias de vacinação, utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos: uso da célula cancerosa inteira, células dendríticas, DNA, RNA, peptídeo, proteínas e vetores virais e bacterianos recombinantes (ATHERTON; LICHTY, 2013).

Em 2010, a Oncept™ foi a primeira vacina contra câncer aprovada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). É uma vacina de DNA de plasmídeo bacteriano que codifica o gene da tirosinase licenciada para o tratamento de melanoma oral estágio II e III. Na literatura existem diversos estudos que verificaram a segurança e eficácia da tirosinase para o tratamento de melanomas em cães (BERGMAN et al., 2003, 2006; GOUBIER et al., 2008; WOLCHOK et al., 2007). Grousenbaugh et al. (2011) avaliaram 58 cães em estágio II e III tratados com Oncept™ após excisão cirúrgica. A sobrevida em cães tratados com a vacina foi maior, porém não houve diferença significativa na mediana de sobrevida em relação ao grupo controle devido à morte de mais de

50% dos animais antes do final do experimento. Não foram observadas alterações sistêmicas, apenas sinais brandos de reação local (GROSENBAUGH et al., 2011). Em contraste, Ottnod et al. (2013) não detectaram diferenças no tempo de sobrevida e progressão da doença em cães tratados ou não com Oncept™ (OTTNOD et al., 2013). Por ser um estudo retrospectivo e com apenas 45 casos, não evidencia segurança do uso da vacina (VAIL, 2013). Recentemente, um estudo com cães com melanoma oral tratados com cirurgia não apresentou benefício ao Oncept™ na terapia (BOSTON et al., 2014).

2.4 Galectina-3

2.4.1 Estrutura e Função

Galectinas são uma família de proteínas capazes de se ligarem à β -galactosidase e compartilham estrutura primária homóloga em seus domínios reconhecedores de carboidratos (CRD) (NEWLACZYL; YU, 2011). Baseado no número e na organização de CRD, as galectinas podem ser divididas em subtipos: grupo protótipo, grupo químera e grupo de tandem repetitivo (HIRABAYASHI; KASAI, 1993). O grupo protótipo corresponde à galectinas que possuem estrutura com apenas um CRD. Galectina-3, ou LGALS-3 (ao longo deste trabalho, utilizaremos a abreviatura “Gal-3”) é o único representante do grupo químera nos mamíferos, possui um CRD que está conectado a um extenso domínio N-terminal (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). As galectinas do grupo de tandem repetitivo possuem uma cadeia única de polipeptídeos que formam dois CRDs distintos. (NEWLACZYL; YU, 2011). As galectinas que possuem apenas um CRD são capazes de formar dímeros e oligodímeros, permitindo ligações bivalente e multivalente com carboidratos, cruciais para seu papel biológico (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Apesar de ser sintetizada no citoplasma, a Gal-3 migra para o núcleo, superfície celular e interstício. A ação da Gal-3 depende de sua localização nos compartimentos celulares. Gal-3 é a galectina mais estudada (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006) e participa de diversos processos biológicos como adesão e proliferação celular, apoptose e remodelamento tecidual (NEWLACZYL; YU, 2011).

O domínio N-terminal é composto de 110-130 aminoácidos formando uma estrutura flexível altamente conservada entre as espécies (OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2004). Esta estrutura é essencial para multimerização da Gal-3, além de ser alvo de proteínas de matriz como MMP-2 e MMP-9 e auxiliar na translocação da Gal-3 para o núcleo (GONG et al., 1999; MENON; HUGHES, 1999; OCHIENG; FURTAK; LUKYANOV, 2004). Possui um resíduo de Ser6 envolvido na atividade antiapoptótica da Gal-3 (YOSHII et al., 2002) e um resíduo Tyr102 que participa da ligação da Gal-3 a carboidratos (BARBONI et al., 2000). A porção C-terminal da Gal-3 é composta por 130 aminoácidos em uma estrutura globosa que abriga o CRD, possui uma sequência de aminoácidos altamente conservada denominada de motivo NWGR, essencial para ligação à galactosidase (SEETHARAMAN et al., 1998). Esse NWGR também está presente nos membros da família BCL2, reguladores antiapoptóticos (YANG; HSU; LIU, 1996).

Gal-3 está presente em células epiteliais humanas, células imunes, neurônios sensoriais (BAO; HUGHES, 1995; CAO et al., 2002; FLOTTE; SPRINGER; THORBECKE, 1983; GUPTA et al., 1997; HEILMANN et al., 2000; HRDLICKOVÁ-CELA et al., 2001; LOTZ et al., 1993; TRUONG et al., 1993), fibroblastos (MOUTSATSOS et al., 1987), osteoclastos (NIIDA et al., 1994) e osteoblastos (COLNOT et al., 1999). Durante o desenvolvimento embrionário, há expressão específica de Gal-3 em tecidos epiteliais, renais, hepáticos e condrócitos (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006), porém ao se impedir a expressão de Gal-3 em camundongos, não houve alterações de desenvolvimento, sugerindo uma possível substituição da função da Gal-3 por outras galectinas (COLNOT et al., 1999). Além de suas funções biológicas, a expressão de Gal-3 foi demonstrada como importante característica tumoral, sendo reportada sua função na transformação neoplásica, regulação apoptótica, controle da resposta imune, angiogênese, adesão celular e formação de metástase (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

2.4.2 Galectina-3 e os *Hallmarks of Cancer*

Em 2000, Hanahan e Weinberg (2000) publicaram *The Hallmarks of cancer*, um dos trabalhos mais importantes na área da oncologia, sintetizando as seis principais características do câncer (Figura 5A) (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Em 2011, o mesmo grupo publicou uma atualização do trabalho, com novas quatro características (Figura 5B) importantes para o desenvolvimento e manutenção neoplásica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Na literatura, é possível encontrar trabalhos que relacionam as funções da Gal-3 com diversos *Hallmarks* do câncer, mostrando o papel crucial desta proteína na biologia tumoral.

Figura 5. A- Os seis primeiros *hallmarks* do câncer: manutenção do sinal proliferativo, evasão de supressores de crescimento, capacidade de se replicar infinitamente, invasão e formação de metástases, angiogênese e resistência à apoptose. B- Os quatro novos *hallmarks*, adicionados em 2011 pelo mesmo grupo: promoção tumoral pela inflamação, evasão do sistema imune, desregulação do metabolismo energético e instabilidade genômica e mutações.

Fonte: Hanahan e Weinberg (2000 e 2011)

2.4.2.1 Apoptose

Como comentado anteriormente, a Gal-3 é capaz de migrar pelos meios intra- e extracelular. Sua localização em meio intracelular tem sido relacionada

com atividade antiapoptótica, e a extracelular indutora de apoptose pela via intrínseca (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). O aumento da expressão de Gal-3 no citoplasma de células cancerosas da próstata humana está relacionado a um efeito antiapoptótico (CALIFICE et al., 2004). Células Jurkat transfectadas com Gal-3 foram resistentes à apoptose provocada por anticorpo anti-Fas quando comparadas ao controle (YANG; HSU; LIU, 1996). Da mesma maneira, Hoyer et al. (2004) demonstraram que células de linfoma de Burkitt foram resistentes a apoptose quando receberam Gal-3 por plasmídeo. O aumento da expressão de Gal-3 em células de tumores mamários de humanos também teve relação com evasão da apoptose induzida por raios UV (MATARRESE et al., 2000).

É sugerido que a Gal-3 se liga ao BCL2 (linfoma de células B-2), proteína anti-apoptótica que regula a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, através do CRD, auxiliando na sua função de estabilizar a membrana mitocondrial e impedindo a liberação do citocromo C (MATARRESE et al., 2000; YU et al., 2002). Tendo em vista que a translocação da Gal-3 para a membrana mitocondrial depende da disponibilidade e funcionalidade de sinexinas, estas podem ser limitantes da ação antiapoptótica da Gal-3 (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). A Gal-3 apresenta 28% de identidade e 48% similaridade com o BCL2, tendo motivo NWGR semelhantes, importante para atividade antiapoptótica de ambas proteínas (AKAHANI et al., 1997).

Nucling, uma molécula pró-apoptótica interage com a Gal-3 no citoplasma e inibe a expressão de Gal-3 aos níveis de RNAm e proteico, sendo que células deficientes em Nucling e com alta expressão de Gal-3 apresentam redução da atividade apoptótica (LIU et al., 2004). Ao se localizar no meio extracelular, a Gal-3 mostrou atividade pró-apoptótica em células de leucemia de células T, células mononucleares do sangue e células T ativadas de camundongos (NAKAHARA; OKA; RAZ, 2005).

2.4.2.2 Angiogênese

Nangia-Makker et al. (2000) demonstraram que a Gal-3 induz a morfogênese de células endoteliais e agrupamento *in vivo*, por meio de ligação

direta da Gal-3 com células endoteliais via CRD. Utilizando modelo de co-cultura de angiogênese *in vitro*, Shekhar et al. (2004) demonstraram que Gal-3 é importante para estabilizar interação entre endotélio e epitélio. A Gal-3 é capaz de modular a angiogênese mediada por VEGF e bFGF por ser capaz de formar ligações cruzadas e agrupamentos com integrinas e ativando migração endotelial e cascata da angiogênese via FAK (MARKOWSKA; LIU; PANJWANI, 2010). O mesmo grupo demonstrou que a Gal-3 se liga ao VEGFR2, impedindo sua internalização e amplificando a resposta angiogênica via VEGF-A (MARKOWSKA; JEFFERIES; PANJWANI, 2011). De maneira semelhante, D'Haene et al. (2013) mostraram que a Gal-3 aumenta o efeito angiogênico da via VEGFR1 por reduzir a endocitose do receptor, reforçando sua importância para as presenças de VEGFR1 e VEGFR2 na superfície das células.

O aumento da Gal-3 circulante em paciente com câncer, induziu a secreção de citocinas como IL-6 e G-CSF pelas células endoteliais, responsáveis por aumentar a expressão de moléculas de adesão nas mesmas, facilitando a migração das células cancerosas e formação de novos túbulos (CHEN et al., 2013). Da mesma forma, Machado et al. (2014) mostraram que ausência de Gal-3 no parênquima e estroma tumoral diminui a angiogênese relacionada com as vias dependentes de macrófagos, como VEGF e TGF β -1. Wesley et al. (2013) mostraram que a expressão de Gal-3 aumenta produção de quinases ligadas a integrinas (ILK) promovendo migração de células endoteliais, proliferação e formação de tubos. O aumento da expressão de Gal-3 esteve relacionado à angiogênese em cânceres de cabeça e pescoço (LOTAN et al., 1994), carcinomas hepatocelulares e de cólon (THIJSSSEN; HULSMANS; GRIFFIOEN, 2008).

2.4.2.3 Proliferação e Crescimento Celular

Foi demonstrado que a Gal-3 induz o crescimento de neuritos e células mesenquimais (PESHEVA et al., 1998; SASAKI; BAO; HUGHES, 1999). Ao ser adicionado a um meio de cultura de fibroblastos pulmonares quiescentes, Gal-3 induziu síntese de DNA e proliferação celular (INOHARA; AKAHANI; RAZ, 1998). Diferentemente, Krugluger et al. (1997) adicionaram Gal-3 a cultura de células

da medula óssea de camundongos e notaram inibição da proliferação dependente da via GM-CSF. É sugerido que os efeitos de inibição da proliferação pela Gal-3 são mediados pelas interações com receptores de superfície glicosilados (SASAKI; BAO; HUGHES, 1999).

Além disso, a Gal-3 atua de maneira distinta na proliferação celular, de acordo com o tipo de célula-alvo. Em células de linfoma Jurkat humanos há aumento da proliferação em células transfectadas com Gal-3 (YANG; HSU; LIU, 1996). Do mesmo modo, a inibição da Gal-3 em células T impede a atividade mitótica (JOO et al., 2001). Ao bloquear a expressão de Gal-3 em carcinomas mamários, Honjo; Nangia-Makker; Inohara (2001) demonstraram supressão do crescimento tumoral. De modo contrário, Ellerhorst et al. (2002) demonstraram que células cancerosas da próstata transfectadas com Gal-3 reduziram seus índices proliferativos *in vitro*.

Gal-3 interage com o complexo K-Ras que inicia uma rede de cascatas responsável pela proliferação celular (ELAD-SFADIA et al., 2004), com estimulação final da ciclina D1 e c-myc (SHIMURA et al., 2004). Em carcinomas hepatocelulares humanos, o silenciamento da Gal-3 diminui os níveis proteicos e de RNAm dos receptores ativadores de plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR), uma proteína do final da via do AKT (ZHENG et al., 2014). Kim et al. (2014) demonstraram que a Gal-3 impede a senescência prematura através da inibição do p27KIP1 na via do pRb no câncer de células gástricas. Gal-3 promove a parada do ciclo celular em G1 pela diminuição nos níveis das ciclinas de G1-S (ciclina E e ciclina A) e estimulando seus inibidores (p21WAF1/CIP1 and p27KIP1) (KIM et al., 1999).

2.4.2.4 Metástase

Gal-3 auxilia na agregação das células cancerosas invasoras de vasos sanguíneos e na adesão das células neoplásicas com endotélio vascular, para manter as células irrigadas pela circulação e atinjam órgãos distantes (INOHARA et al., 1996; NANGIA-MAKKER et al., 2000; SHEKHAR et al., 2004). Ao se comparar pacientes saudáveis com pacientes com doença metastática, Iurisci et al. (2000) demonstraram níveis maiores de Gal-3 circulante em pacientes com

metástases. A Gal-3 é capaz de regular a expressão de fatores de transcrição responsáveis pela progressão neoplásicas, como β -catenina (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014a). Gal-3 influencia na adesão célula-matriz extracelular, que permite liberação de células do sítio primário de implantação tumoral para migração e invasão através circulação (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014b).

Diversas proteínas relacionadas com a progressão metastática são sítios de ligação para Gal-3, como laminina, fibronectina, elastina, colágeno IV, tenascina-C e tenascina-R (KUWABARA; LIU, 1996; OCHIENG et al., 1999; SATO; HUGHES, 1992; VAN DEN BRÛLE et al., 1995). Saravanan et al. (2009) mostraram que Gal-3 ativa quinases de adesão focal (FAK), importantes reguladores da sinalização celular das integrinas, e o Rac1, molécula responsável pela reorganização do esqueleto de actina e ligação com integrinas. Kim et al. (1999) sugere que Gal-3 seja determinante para a sobrevivência das células cancerosas durante a disseminação neoplásica.

2.4.2.5 Resposta Imune

De modo geral, Gal-3 é um poderoso sinal pró-inflamatório quando secretada ou externalizada atuando por mecanismos autócrinos ou parácrinos (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Interrupção na expressão do gene da Gal-3 em camundongos resultou na queda do números de granulócitos e macrófagos, após indução de peritonite (COLNOT et al., 1998; HSU et al., 2000a). Macrófagos $gal^{-/-}$ exibem redução da fagocitose de eritrócitos e timócitos opsonizados *in vitro* (COLNOT et al., 1998). A capacidade antiapoptótica da Gal-3 permite a sobrevida das células inflamatórias e manutenção dos estímulos pré-inflamatórios (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

A Gal-3 potencializa a produção de interleucina 1 (IL-1), induzida pela presença de lipopolissacarídeos (LPS), ampliando produção de monócitos e neutrófilos (LIU et al., 1995; YAMAOKA et al., 1995). Em neutrófilos humanos localizados em lesões de pele, Gal-3 ativa a oxidase-NADPH resultando em liberação de radicais livres e explosão respiratória após estímulo (KARLSSON

et al., 1998). O aumento da fosforilação oxidativa de neutrófilos é paralelo à ligação de Gal-3 a superfícies de células, possivelmente por meio de receptores de membrana como CD66a e CD66b (FEUK-LAGERSTEDT et al., 1999). Fernández et al. (2005) descreveu que a expressão de Gal-3 promovia um aumento na atividade fagocitárias de neutrófilos e expressão de CD66 na superfície celular.

A Gal-3 extracelular age na quimioatração de monócitos e macrófagos, mostrando que tanto as porções CRD e N-terminal são importantes para essa função. Altas doses de Gal-3 possuem características quimioatrativas enquanto em baixas doses apresenta ação quimiocinética, ou seja, movimentos celulares sem direção. Além disso, a Gal-3 induz influxo de cálcio pelos monócitos para sua movimentação (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006).

A Gal-3 tem capacidade de reconhecer glicosídeos de patógenos, havendo relatos de ligação da Gal-3 com LPS de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (MANDRELL et al., 1994; MEY et al., 1996). Essa interação com LPS pode ocorrer de duas formas: através do CRD que se liga à β -galactosidase e através da porção N-terminal que interage com lipídio A (DUMIC; DABELIC; FLÖGEL, 2006). Gal-3 interage com glicolípídeos componentes da *Mycobacterium tuberculosis* e se acumula em fagossomos de macrófagos durante a infecção. Camundongos deficientes de Gal-3 diminuem a capacidade de eliminar infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (BEATTY et al., 2002; VAN DEN BERG et al., 2004).

2.4.3 Galectina-3 em Neoplasias

Em neoplasias humanas, são descritas variações da expressão de Gal-3. O aumento da expressão de Gal-3 foi observado e associado à progressão em neoplasias gástricas, pulmonares, colorretais, pancreáticas; carcinomas hepatocelulares, foliculares de tireoide, nasofaríngeos, de células escamosas e esofágicos; linfomas de grandes células B, osteossarcomas, melanomas, astrocitomas e glioblastomas (BROWN et al., 2012; CHENG; DONG; LUO, 2004; D'HAENE et al., 2005; DEBRAY et al., 2004; ENDO et al., 2005; PUGLISI et al., 2004; SHIBATA et al., 2005; XIE et al., 2012; ZHOU et al., 2014). A diminuição

e supressão da expressão de Gal-3 foi encontrada e relacionada à progressão em cânceres de pele não-melanocíticos, carcinomas mamários e endometriais, tumor de próstata, e leucemia linfocítica crônica (CASTRONOVO et al., 1996; CHENG et al., 2011; KAPUCUOGLU et al., 2009; WANG et al., 2009).

Em cultura de células de carcinomas foliculares da tireoide, houve maior expressão de galectina-3 em neoplasias mais agressivas (TAKENAKA et al., 2003). Dange et al. (2014) demonstraram, por imuno-histoquímica, a presença desta proteína em todos os tecidos pulmonares que sofreram metástases de melanoma em camundongos, e evidenciaram seu envolvimento com a invasão do parênquima cerebral por astrocitomas. Em contrapartida, Endo et al. (2005) não encontraram valor prognóstico para a imunoexpressão de galectina-3 em câncer colorretal. Em linfomas primários de sistema nervoso central, a galectina-3 serve de fator prognóstico independente em pacientes imunocompetentes (D'HAENE et al., 2008). Honjo et al. (2000), demonstrou que a migração da galectina-3 do núcleo para o citoplasma de células de carcinoma de língua serve de ferramenta prognóstica na progressão da doença.

Em carcinomas de cérvix, Lee et al. (2006) observaram redução na imunoexpressão de galectina-3 à medida que o carcinoma progride. Em pacientes com câncer gástrico, os níveis séricos de galectina-3 não tiveram relação com diagnóstico e prognóstico (TAS et al., 2016). Li et al. (2013) observaram que a expressão de galectina-3 em nevos benignos foi maior que em melanomas de pele em humanos, relacionando a diminuição na marcação nuclear com pior prognóstico. Por outro lado, Braeuer et al. (2012) demonstraram que a galectina-3 contribui para o desenvolvimento e regulação de metástases em melanomas. Em tumores de mama, a presença de galectina-3 no núcleo e citoplasma não teve relação com o prognóstico, porém quando encontrada no estroma teve relação com a sobrevida do paciente (MOISA et al., 2007).

Em medicina veterinária, existem poucos estudos avaliando a galectina-3 como fator prognóstico para neoplasias. Carcinomas mamários caninos apresentaram baixa expressão de galectina-3 e houve aumento da expressão nas metástases, porém não foi avaliado o prognóstico neste estudo (DE OLIVEIRA et al., 2010). Altos níveis séricos de galectina-3 foram encontrados em casos de tumores de mama com metástases e sem metástase, porém os

animais sem metástase tinham regressão nos níveis de galectina-3 após a cirurgia, enquanto os animais com metástase mantinham alta concentração dessa proteína no soro (RIBEIRO et al., 2016).

É possível notar que há resultados divergentes, alguns relacionando o aumento da expressão de galectina-3 a um pior prognóstico, enquanto outros a melhores evoluções. Apesar de ser considerado um marcador prognóstico para certas neoplasias, são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação da galectina-3 com a biologia neoplásica e relação com prognóstico do paciente. Até o momento, não foram encontrados trabalhos sobre a expressão de galectina-3 como fator prognóstico para melanomas de cavidade oral em nenhuma espécie.

3. Material e Métodos

3.1 Origem do Material e Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram obtidas 39 amostras de melanomas de cães da cavidade oral provenientes das clínicas especializadas em oncologia e/ou odontologia de São Paulo, Odontovet e Oncocane. Completam o quadro amostral 1 amostra proveniente do laboratório Histopet com acompanhamento adequado e 3 lâminas de Tissue Micro Array (TMA) com 36 amostras de melanoma canino cada, gentilmente fornecidos pela Profa. Adriana Tomoko Nishiya da Universidade Anhembi Morumbi.

Para inclusão nesse estudo, as amostras deveriam conter: histórico retrospectivo completo com idade ao diagnóstico, sexo, raça, localização do tumor, data da primeira consulta, data da cirurgia, tempo de sobrevivência pós-cirúrgica e *causa mortis*. As informações foram obtidas por meio de consulta de prontuários e entrevista com proprietários e/ou médicos veterinários por telefone ou e-mail. O acompanhamento clínico foi realizado por um período mínimo de 6 meses. Animais vivos ao final do estudo ou que vieram a óbito por outras causas não-relacionadas ao melanoma foram considerados censurados para análise estatística.

3.2 Processamento Histopatológico

Os tumores foram fixados em formol a 10% por 48 horas e processados para histopatologia de acordo com técnicas rotineiras de inclusão em parafina no Instituto Veterinário de Imagem em São Paulo. No Laboratório de Patologia Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), foram realizados os cortes de aproximadamente 4 µm de espessura e corados pela técnica da hematoxilina & eosina (H&E) (PROPHET et al., 1992).

3.3 Processamento Imuno-histoquímico

Os cortes histológicos de melanomas caninos foram aderidos em lâminas de vidro silanizadas (Starfrost®) e desparafinados em estufa por 40 minutos a 65°C, seguidos de duas imersões em xilol, de 15 minutos cada. Banhos decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 70%) de 5 minutos e, por fim, banho em água corrente e água destilada para hidratação.

Como utilizamos o DAB de cromógeno para a reação, foi realizado tratamento para remoção da melanina das amostras (*“bleaching”*), por aquecimento em solução de peróxido de hidrogênio a 10%, a 65°C, em banho-maria escuro, por 45 minutos (LIU et al., 2013). Além de remover a melanina do tecido, este tratamento já promove o bloqueio de peroxidase endógena. Em seguida, realizamos três lavagens em solução tampão (PBS) + Tween20 a 1%, por 5 minutos cada, com exceção do procedimento para o anticorpo BCL2 que necessita de solução tampão TBS + Tween20 a 1%. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica, variando para cada anticorpo, conforme especificado na Tabela 1. Após resfriamento por 20 minutos no próprio tampão, as amostras foram lavadas em água destilada e, em seguida lavadas por três vezes em solução tampão de 5 minutos cada. Os bloqueios de antígenos inespecíficos foram diferentes para cada anticorpo e também estão descritos na Tabela 1.

A incubação do anticorpo primário foi realizada *overnight* à temperatura de 4°C, com as diluições descritas na Tabela 1. As lâminas de controle negativo foram incubadas com IgG normal, sob as mesmas condições que as amostras positivas, a fim de confirmar a especificidade do anticorpo e desconsiderar interações inespecíficas. No dia seguinte, as amostras eram novamente lavadas três vezes em solução tampão por 5 minutos cada, em seguida foram incubadas com anticorpo secundário (EasyLink ONE, EP-12-20502, EasyPath) por 15 minutos em temperatura ambiente. A revelação foi realizada com o cromógeno Diaminobenzidina (Cromógeno DAB, EP-12- 20542, EasyPath), por 30 segundos, seguido de banho em água destilada. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina por 30 segundos, seguida de lavagem em água corrente. Em seguida foi realizada a desidratação da lâmina e montagem da lamínula.

Quadro 1. Resumo dos anticorpos e procedimentos imuno-histoquímicos para diluição, recuperação antigênica e bloqueio de proteínas inespecíficas para cada anticorpo do estudo (Gal-3, Ki67, Cocktail, BCL2 e CASP3).

Anticorpo	Marca	Diluição	Recuperação Antigênica	Bloqueio de Proteínas
Galectina-3	Abcam®	1:1000	Citrato pH 6,0; 95°C steamer; 20 min	Leite desnatado 5%; 15 min
Ki67	Dako Cytomation®	1:100	Citrato pH 6,0; 100°C panela pressão; 2 min	Sem bloqueio
Cocktail (HMB-45, Melan-A e Tirosinase)	Cell Marque®	<i>Ready-to-use</i>	Citrato pH 6,0; 100°C panela pressão; 2 min	Sem bloqueio
BCL2	Santa Cruz Biotechnology®	1:1500	TRIS EDTA pH 9,0; 100°C panela pressão; 2 min	Leite desnatado quente 5%; 30 min
CASP3	Abcam®	1:1500	Citrato pH 6,0; 95°C steamer; 25 min	Leite desnatado quente 5%; 25 min

FONTE: Própria autoria

3.4 Avaliação de parâmetros histopatológicos

As avaliações de grau de pigmentação, atipia nuclear e índice mitótico foram realizadas utilizando lâminas coradas em H&E. Com relação ao grau de pigmentação, as amostras foram classificadas em melanomas melânicos (presença de melanina) e melanomas amelanicos (ausência de melanina).

Para avaliação de atipia nuclear foi utilizada a metodologia de Spangler e Kass (2006), avaliada em uma escala de 0 a 10, de acordo com a porcentagem de células que apresentam núcleos atípicos em 100 células. Com relação ao

índice mitótico, utilizamos metodologia de Bergin et al. (2011) obtido pela média da contagem de mitoses em 10 campos à objetiva de 40x (*high-power fields* - HPF) consecutivos não sobrepostos com foco em áreas de alta atividade mitótica (*hot spots*). Ambos os parâmetros foram obtidos em lâminas coradas por H&E após procedimento de *bleaching* para remoção da melanina.

3.5 Avaliação das Imunomarcações

Para avaliação da imunomarcação de Gal-3 utilizamos dois métodos. O primeiro foi baseado em metodologias semiquantitativas (BROWN et al., 2012; JIANG et al., 2014; ZHOU et al., 2014), avaliando intensidade de marcação e porcentagem de células positivas, com posterior somatória dos escores. A intensidade foi obtida utilizando-se a objetiva de 10x, sendo classificada como muito forte (3), caso fosse possível determinar localização da marcação e o tipo histológico predominante; marcação forte (2) quando era possível visualizar a marcação no aumento de 10X, porém não era possível distinguir a localização da marcação (núcleo ou citoplasma); e por fim consideradas de fraca (1) marcação quando não era possível visualizar a marcação no aumento de 10X.

Já a avaliação da porcentagem de células marcadas foi dividida em três escores: 0-25% células marcadas (1), 26-50% células marcadas (2) e 51-100% células marcadas (3). O escore total de marcação de Gal-3 era obtido através da multiplicação do escore de intensidade pelo escore de porcentagem de células marcadas, obtendo o que denominamos "*Histoscore*", que variou de 0 a 9. Dessa forma foi possível dividir as amostras em dois grupos qualitativos: baixa expressão de Gal-3 (escore 0-3) e alta expressão de Gal-3 (escore 4-9). Além disso, estabelecemos escore de porcentagem de marcação nuclear dentre os melanócitos neoplásicos marcados: 0-25% dos núcleos marcados (1), 26-50% dos núcleos marcados (2) e 51-100% dos núcleos marcados.

A outra metodologia utilizada para avaliar Gal-3 foi quantitativa, com a contagem de células neoplásicas com citoplasma positivo e negativo em cinco *hot spots*, obtendo-se a porcentagem de células marcadas. Além disso, foi determinada a porcentagem de células com núcleos positivos em relação nos mesmos cinco *hot spots*.

Com relação à imunomarcação de Ki67, utilizamos a metodologia de Bergin et al. (2011), realizando a contagem de núcleos positivos em 5 *hot spots*, evitando áreas de inflamação, necrose e bordas da lesão. Após a contagem realizou-se a média dos cinco campos para estabelecer o valor de índice de Ki67.

Para avaliação de BCL2, foram utilizados parâmetros semiquantitativos de intensidade e porcentagem (SAMPAIO-GÓES et al., 2005; SOINI et al., 2001), sendo a intensidade avaliada como: negativo (escore 0), muito fraco (escore 1), fraco (escore 2), forte (escore 3) e muito forte (escore 4); e a porcentagem de células marcadas como: 0-25% células marcadas (escore 1), 26-50% células marcadas (escore 2), 51-75% células marcadas (escore 3) e 76-100% células marcadas (escore 4). A avaliação de Caspase3 (CASP3) foi realizada baseado na metodologia de (RAMOS DA SILVA et al., 2007) estabelecendo porcentagem de melanócitos marcados em cinco *hot spots* em três escores: negativo (escore 0), <1% de melanócitos marcados (escore 1) e >1% de melanócitos marcados (escore 2). Todas as fotos de lâminas foram avaliadas por meio de software de análise de imagens ImageJ ® (NIH, EUA). O *Cocktail* foi utilizado para confirmação dos diagnósticos de melanoma, aplicado apenas em amostras de melanomas amelanicos.

3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos nas análises imuno-histoquímicas foram comparados com as variáveis sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito em função do tumor e sobrevida maior ou menor que 1 ano por meio de Testes de Mann-Whitney. Para os marcadores paramétricos foi utilizado Teste t não-pareado. As associações dos marcadores com a mortalidade devido a neoplasia foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson para variáveis paramétricas e de Spearman para variáveis não-paramétricas. As sobrevidas foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier seguido de *logrank test*. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism® (versão 7.0a para MacOS X, GraphPad Software Inc.®) com nível de significância de 5%.

4. Resultados

4.1 Avaliação da População Estudada

Dentre as 75 amostras obtidas, foi possível completar o acompanhamento clínico de 27 casos. Foram avaliadas 27 lesões de 27 animais submetidos a cirurgia excisional com confirmação diagnóstica de melanoma oral canino por avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. Na Tabela 2, estão os dados clínicos dos animais incluídos no estudo. Com relação ao gênero, 18 (66,67%) eram machos e 9 (33,33 %) fêmeas. Quanto à raça, 6 eram Poodle (22,2%), 5 Cocker Spaniel (18,52%), 4 Golden Retriever (14,82%), 2 Schnauzer, 2 Rottweiler e 2 sem raça definida (7,42% cada). As raças Dachshund, Husky siberiano, Shih Tzu, Weimaraner, Lhasa Apso e Yorkshire foram representadas por um exemplar (3,70% cada). A idade média ao diagnóstico foi de 13 anos ($13 \pm 2,98$). As lesões estavam distribuídas em mandíbula (15/25, 60%), maxila (9/25, 36%) e lábio (1/25, 4%). A amostra 12 era um melanoma em múltiplos locais da cavidade oral e as informações sobre localização não foram localizadas para as amostras 15, 18 e 26. O período médio de acompanhamento de sobrevivência dos animais foi de 324 dias, variando de 454 a 1402 dias para animais censurados e de 8 a 1070 dias para os animais que vieram a óbito em função do tumor. Dos 27 animais, 24 morreram ou foram eutanasiados devido ao melanoma. Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevivência pós-cirúrgica quando comparado o sexo ($p = 0,9949$).

Quadro 2. Distribuição de casos de melanoma oral canino segundo nossos números de controle: sexo, raça, idade, sobrevida e localização da lesão, São Paulo, 2016.

Amostra	Sexo	Raça	Idade (anos)	Sobrevida Pós Cirúrgica (dias)	Localização
01	F	Poodle	15	155	Mandíbula
02	M	Husky siberiano	10	392	Maxila
03	M	Weimaraner	14	407	Mandíbula
04	M	Cocker Spaniel	15	1402	Mandíbula
05	M	Golden Retriever	11	486	Mandíbula
06	F	Schnauzer	13	206	Mandíbula
07	M	Cocker Spaniel	16	1070	Lábio
08	M	Poodle	12	55	Maxila
09	F	Dachshund	16	181	Maxila
10	M	SRD	17	8	Mandíbula
11	M	Yorkshire	14	117	Mandíbula
12	F	Rottweiler	13	220	Maxila e Mandíbula
13	M	Shih Tzu	10	193	Maxila
14	F	Golden Retriever	11	205	Mandíbula
15	M	Rottweiler	14	18	-
16	F	Poodle	15	621	Mandíbula
17	F	Cocker Spaniel	17	230	Mandíbula
18	M	Golden Retriever	6	48	-
19	F	Schnauzer	11	373	Maxila
20	M	Poodle	19	163	Mandíbula
21	F	Cocker Spaniel	12	114	Mandíbula
22	F	Poodle	13	222	Maxila
23	M	Cocker Spaniel	15	181	Mandíbula
24	M	Poodle	16	126	Mandíbula
25	M	Lhasa Apso	9	454	Maxila
26	F	Golden Retriever	8	183	-
27	M	SRD	11	266	Maxila

4.2 Avaliação das Marcações Imuno-histoquímicas de Galectina-3

As imunomarcações para Gal-3 foram positivas para todas as amostras incluídas no estudo, variando em porcentagem e intensidade. Na Tabela 3 estão descritos resultados das análises semiquantitativas: escores de porcentagem e intensidade, porcentagem de células marcadas no núcleo, histoscore, expressão qualitativa (alta x baixa); e os resultados obtidos pela metodologia quantitativa: contagem de células e contagem de núcleos marcados.

Quadro 3. Dados da análise de imunomarcção de Gal-3 em melanomas orais caninos.

Amostra	Avaliação semiquantitativa					Avaliação quantitativa	
	Escore %	Escore Intensidade	Escore % Núcleo	Histocore	Alta x Baixa	Contagem (%)	Contagem Núcleo (%)
01	1	1	3	1	Baixa	27,37	45,91
02	3	3	2	9	Alta	74,88	39,05
03	3	3	2	9	Alta	92,65	48,33
04	3	2	1	6	Alta	55,11	56,59
05	2	1	1	2	Baixa	41,07	56,11
06	1	2	3	2	Baixa	34,74	47,88
07	3	3	3	9	Alta	62,50	67,19
08	1	2	3	2	Baixa	50,00	67,53
09	1	2	2	2	Baixa	9,93	42,37
10	1	2	3	2	Baixa	77,15	61,23
11	1	1	3	1	Baixa	51,56	39,40
12	1	1	1	1	Baixa	7,96	30,33
13	1	1	1	1	Baixa	56,13	26,90
14	2	3	2	6	Alta	64,82	47,69
15	1	3	3	3	Baixa	33,35	71,55
16	1	2	1	2	Baixa	39,28	21,94
17	3	3	1	9	Alta	63,20	34,66
18	1	3	3	3	Baixa	58,53	64,49
19	2	3	1	6	Alta	49,69	40,80
20	2	2	2	4	Alta	56,66	50,27
21	2	3	3	6	Alta	33,96	54,11
22	2	2	3	4	Alta	30,64	52,15
23	1	1	2	1	Baixa	36,24	49,40
24	3	3	2	9	Alta	61,70	80,00
25	2	3	3	6	Alta	11,58	57,08
26	1	3	3	3	Baixa	57,34	48,57
27	2	2	2	4	Alta	35,62	52,12

4.2.1 Análise semiquantitativa da expressão de Gal-3

Os escores de intensidade e porcentagem são representados nas figuras 6 e 7, respectivamente. Os valores obtidos para os parâmetros semiquantitativos foram comparados entre os grupos segundo gênero (machos x fêmeas), tipo histológico (mistos x epitelioides), grau de pigmentação (melânicos x amelânicos), óbito (óbito em função do tumor x casos censurados) e período de sobrevida (menor que 1 ano x maior que 1 ano). Os resultados encontram-se listados na Tabela 4. Os animais com sobrevida pós-cirúrgica acima de 1 ano apresentaram maior porcentagem de células positivas para Gal-3 ($p=0,0387$). Os demais grupos comparados não apresentaram diferenças significantes com relação a expressão de Gal-3 avaliada por escores.

Figura 6. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Escore 1 de porcentagem de Gal-3 (0-25% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); B- Escore 2 de porcentagem de Gal-3 (26-50% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); C- Escore 3 de porcentagem de Gal-3 (51-100% das células marcadas ao longo de todo o corte, 10x); D- Controle negativo para reação do anticorpo Gal-3 com IgG de camundongo (40x). Hematoxilina de Harris.

Figura 7. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Escore 1 de intensidade de marcação da Gal-3 (fraca), não sendo possível notar marcação na objetiva de 10x; B- Escore 2 de intensidade marcação da Gal-3 (forte), sendo possível verificar marcação na objetiva de 10x, porém a localização da marcação não é clara; C- Escore 3 com intensidade de marcação da Gal-3 (muito forte), sendo possível notar a localização da marcação na objetiva de 10x; D- Controle negativo da reação do anticorpo Gal-3 com IgG de camundongo (40x). Hematoxilina de Harris.

Tabela 1. Resultados dos Testes t de Mann-Whitney comparando os escores de marcação de Gal-3 com as variáveis de sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito em função do tumor e sobrevida maior que 1 ano. *diferença estatística.

Gal-3	Grupos comparados	p
Escore %	Macho x Fêmea	0,4277
	Epiteliode x Misto	0,2799
	Melânico x Amelânico	0,9677
	Óbito tumor x censurados	0,7156
	<1 ano x >1 ano	0,0387*
Escore Intensidade	Macho x Fêmea	0,8691
	Epiteliode x Misto	0,4376
	Melânico x Amelânico	0,7426
	Óbito tumor x censurados	0,9999
	<1 ano x >1 ano	0,4196
Escore Núcleo	Macho x Fêmea	0,8066
	Epiteliode x Misto	0,3488
	Melânico x Amelânico	0,8797
	Óbito tumor x censurados	0,8851
	<1 ano x >1 ano	0,0833
Histoscore	Macho x Fêmea	0,6863
	Epiteliode x Misto	0,3242
	Melânico x Amelânico	0,6689
	Óbito tumor x censurados	0,6062
	<1 ano x >1 ano	0,0727
Alto x Baixo grau	Macho x Fêmea	0,9999
	Epiteliode x Misto	0,3259
	Melânico x Amelânico	0,7064
	Óbito tumor x censurados	0,5956
	<1 ano x >1 ano	0,2365

Em seguida, realizamos testes de correlação dos parâmetros obtidos pela metodologia semiquantitativa com as variáveis de sobrevida pós-cirúrgica, grau de atipia nuclear, índice mitótico, índice de Ki67, expressão de BCL2 e expressão da CASP3. Os resultados destas análises encontram-se listados na Tabela 5. A expressão de BCL2 leva em consideração escores de intensidade e porcentagem e foram avaliados com a mesma metodologia da Gal-3.

Tabela 2. Resultados análise de correlação comparando marcação de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica e marcadores prognósticos e de apoptose. *diferença estatística.

Gal-3	Valor de p e r Sobrevida	Marcador	p	r
Escore %	p = 0,014* r = 0,4758	Atipia Nuclear	0,4760	-
		Índice Mitótico	0,8163	-
		Ki67	0,4783	-
		BCL2 Intensidade	0,0100*	0,497
		BCL2 %	0,3333	-
		CASP3	0,2333	-
Escore Intensidade	p = 0,8695	Atipia Nuclear	0,9393	-
		Índice Mitótico	0,2904	-
		Ki67	0,2618	-
		BCL2 Intensidade	0,3510	-
		BCL2 %	0,3310	-
		CASP3	0,6670	-
Escore Núcleo	p = 0,0065* r = -0,5197	Atipia Nuclear	0,2212	-
		Índice Mitótico	0,3527	-
		Ki67	0,6864	-
		BCL2 Intensidade	0,0580	-
		BCL2 %	0,2973	-
		CASP3	0,3389	-
Histoscore	p = 0,1220	Atipia Nuclear	0,6222	-
		Índice Mitótico	0,5477	-
		Ki67	0,2475	-
		BCL2 Intensidade	0,0450*	0,397
		BCL2 %	0,9922	-
		CASP3	0,4111	-
Alto x Baixo grau	p = 0,0799	Atipia Nuclear	0,5163	-
		Índice Mitótico	0,6523	-
		Ki67	0,0898	-
		BCL2 Intensidade	0,0211*	0,450
		BCL2 %	0,6630	-
		CASP3	0,4703	-

Obtivemos correlação positiva fraca, porém significativa, entre a porcentagem de células marcadas por Gal-3 e sobrevida pós-cirúrgica (p = 0,014, r = 0,4758). No que se refere à marcação da Gal-3 no núcleo das células neoplásicas, houve correlação moderada negativa com a sobrevida pós-cirúrgica (p = 0,0065, r = -0,5197) (figura 8). Para determinar se estes parâmetros são marcadores prognósticos quanto à sobrevida, utilizamos a análise de Kaplan-Meier. Contudo, não obtivemos diferenças estatisticamente significantes entre os três escores de porcentagem (p = 0,1723), nem quando estabelecemos um

ponto de corte de 25% (0-25% x 26-100%; $p = 0,0767$) ou de 50% (0-50% x 51-100%; $p = 0,1469$).

Figura 8. Gráficos de correlação dos escores de expressão de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica. A- Gráfico de correlação entre escore de porcentagem de marcação geral (núcleo e citoplasma) de Gal-3 e sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0,0014$, $r = 0,4758$). B- Gráfico de correlação entre escore de porcentagem de núcleos marcados com sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0,0065$, $r = -0,5197$). As retas demonstram a tendência dos dados.

Com relação aos marcadores prognósticos atipia nuclear, índice mitótico e Ki67 não obtivemos correlações estatísticas com os escores de expressão da Gal-3. Para os marcadores apoptóticos, obtivemos uma correlação positiva fraca entre o escore de porcentagem da Gal-3 com a intensidade de BCL2 ($p = 0,0100$, $r = 0,497$). Essa significância se mantém nas avaliações por histoscore ($p = 0,450$, $r = 0,397$) e na análise qualitativa (alto e baixo grau) de expressão de Gal-3 ($p = 0,0211$, $r = 0,450$). No que se refere aos demais parâmetros analisados na expressão de Gal-3, não obtivemos correlação com a expressão de BCL2. Não houve correlação da expressão de CASP3 com a expressão de Gal-3.

4.2.2 Análise quantitativa da expressão de Gal-3

Os valores de contagem obtidos pela análise quantitativa também foram comparados entre os grupos segundo gênero (machos x fêmeas), tipo histológico (mistos x epitelioides), grau de pigmentação (melânicos x amelanicos), óbito (óbito em função do tumor x casos censurados) e período de sobrevida (menor que 1 ano x maior que 1 ano) (Tabela 6). Não encontramos diferenças estatisticamente significantes para porcentagem de células marcadas

entre os grupos. Porém, a porcentagem de núcleos marcados foi maior em machos ($55,45 \pm 13,50$) que em fêmeas ($42,40 \pm 9,83$; $p = 0,0112$), e maior em tumores epitelioides ($52,85 \pm 12,71$) que em mistos ($38,17 \pm 11,62$; $p = 0,0262$) (Figura 9).

Tabela 3. Resultados do Teste t não-pareado comparando contagem de Gal-3 entre grupos das variáveis sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito devido ao tumor, sobrevivida maior que 1 ano. * diferença estatística.

Contagem Gal-3	Grupos Comparados	p
% de células marcadas	Macho x Fêmea	0,0548
	Epitelióide x Misto	0,2228
	Melânico x Amelânico	0,7172
	Óbito tumor x censurados	0,0510
	<1 ano x >1 ano	0,8148
% de núcleos marcados	Macho x Fêmea	0,0112*
	Epitelióide x Misto	0,0262*
	Melânico x Amelânico	0,5333
	Óbito tumor x censurados	0,8053
	<1 ano x >1 ano	0,5244

Figura 9. Gráficos de comparação entre grupos de sexo e tipo histológico com relação a contagem de núcleos marcados com Gal-3. A- Gráfico da comparação entre fêmeas ($42,40 \pm 2,965$) e machos ($55,45 \pm 3,374$) referente à contagem de núcleos que expressam Gal-3 ($p = 0,0112$). B- Gráfico da comparação entre tumores epitelioides ($38,17 \pm 5,196$) e mistos ($52,85 \pm 2,709$) referente à contagem de núcleos que expressam Gal-3 ($p = 0,0262$).

As análises de correlação com as variáveis de sobrevida pós-cirúrgica, escores de atipia nuclear, índice mitótico e expressões de Ki67, BCL2 e CASP3 encontram-se descritas na Tabela 7 e não foram estatisticamente significantes.

Tabela 4. Resultados análise de correlação comparando a contagem de Gal-3 com sobrevida pós-cirúrgica e marcadores prognósticos e de apoptose. *diferença estatística.

Contagem Gal-3	p da Sobrevida	Marcador	p
% de células marcadas	0,7437	Atipia Nuclear	0,6491
		Índice Mitótico	0,9503
		Ki67	0,6672
		BCL2 Intensidade	0,4177
		BCL2 %	0,8790
		CASP3	0,9201
% de núcleos marcados	0,1059	Atipia Nuclear	0,9403
		Índice Mitótico	0,4154
		Ki67	0,3244
		BCL2 Intensidade	0,9832
		BCL2 %	0,9988
		CASP3	0,6333

4.3 Avaliação dos demais marcadores

4.3.1 Parâmetros histopatológicos

Os parâmetros que foram avaliados através da histopatologia foram: grau de pigmentação, tipos histológicos, índice mitótico e atipia nuclear. Os resultados das análises de cada marcador prognóstico estão descritos na Tabela 8. No que diz respeito ao grau de pigmentação, obtivemos que 14/27 (51,85%) tumores eram melânicos e 13/27 (48,15%) eram amelanicos. Com relação aos tipos histológicos, 23/27 (85,18%) apresentavam padrão histológico misto e 4/27 (14,82%) epitelióide. A média de índice mitótico foi de 1,8, variando de 1,0 a 9,0. As diferenças histológicas dos graus de pigmentação, tipos histológicos, índice mitótico e escores de atipia nuclear estão representadas nas figuras 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

Quadro 4. Distribuição das lesões analisadas em função do grau de pigmentação, tipos histológicos, índice mitótico e escores de atipia nuclear.

Amostra	Pigmentação	Tipos Histológicos	Índice Mitótico	Atipia Nuclear
01	Melânico	Misto	2,3	7
02	Amelânico	Misto	3,2	5
03	Amelânico	Epiteliode	2,0	2
04	Amelânico	Misto	3,0	3
05	Melânico	Misto	6,5	4
06	Amelânico	Epiteliode	1,7	5
07	Melânico	Misto	1,3	4
08	Amelânico	Misto	1,0	3
09	Melânico	Epiteliode	1,2	3
10	Melânico	Misto	1,3	7
11	Melânico	Misto	1,4	5
12	Amelânico	Epiteliode	1,1	5
13	Melânico	Misto	4,8	5
14	Melânico	Misto	1,4	4
15	Amelânico	Misto	1,5	6
16	Melânico	Misto	3,0	3
17	Melânico	Misto	2,9	7
18	Amelânico	Misto	1,4	5
19	Amelânico	Misto	1,1	4
20	Melânico	Misto	1,7	5
21	Amelânico	Misto	1,1	5
22	Amelânico	Misto	1,0	5
23	Amelânico	Misto	2,6	4
24	Melânico	Misto	9,0	6
25	Melânico	Misto	2,2	3
26	Melânico	Misto	2,1	5
27	Amelânico	Misto	5,0	5

Figura 10. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Melanoma melânico com presença de pigmento acastanhado citoplasmático. B- Melanoma amelanico em que o pigmento citoplasmático está ausente. Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.

Figura 11. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Amostra com alta taxa mitótica por campo (setas). B- Amostra com baixa taxa mitótica por campo (seta). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.

Figura 12. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Predomínio do tipo celular epitelióide. B- Melanoma do tipo misto, composto por células epitelióides (seta preta) e células fusiformes (seta vermelha). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.

Figura 13. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Amostra com escore alto de atipia nuclear (64% das células – escore 7). B- Amostra com escore baixo de atipia nuclear (27% das células – escore 3). Hematoxilina e eosina, objetiva de 40x.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de sobrevida e comparados entre os grupos: óbito devido ao tumor x censurados; e sobrevida maior que 1 ano x menor que 1 ano (Tabela 9). Na análise de sobrevida, o grau de pigmentação, tipo histológico e índice mitótico não apresentaram diferenças significantes. O mesmo ocorreu na comparação entre grupos de sobrevida maior que 1 ano e óbito devido ao tumor.

Com relação à atipia nuclear, houve uma correlação moderada e negativa ($p = 0,0008$, $r = -0,6153$) com os tempos de sobrevida pós-cirúrgica (figura 14). A atipia nuclear foi maior para os animais que morreram em função tumor quando comparados aos censurados ($p = 0,0103$) e para os que tiveram sobrevida menor que 1 ano ($p = 0,0002$). Após estabelecermos como ponto corte o escore 4 (escores 0 a 4 = baixo grau de atipia; escores 5 a 10 = alto grau de atipia), a análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier revelou que o grupo com alto grau de atipia nuclear possui sobrevida significativamente menor ($p = 0,0004$; mediana de sobrevida para o grupo com alto grau de atipia = 173 dias; mediana de sobrevida para o grupo com baixo grau de atipia = 486 dias; Figura 14)

Tabela 5. Resultados da análise de sobrevida para os marcadores histológicos e do teste t de Mann-Whitney entre grupos das variáveis de óbito devido ao tumor e sobrevida maior que 1 ano e * diferença estatística.

Marcador	p da Sobrevida	Variáveis	p
Pigmentação	0,7437	Óbito tumor x censurados	>0,9999
		<1 ano x >1 ano	>0,9999
Tipo histológico	0,1059	Óbito tumor x censurados	>0,9999
		<1 ano x >1 ano	0,2950
Índice Mitótico	0,0831	Óbito tumor x censurados	0,6764
		<1 ano x >1 ano	0,4346
Atipia Nuclear	0,0008*	Óbito tumor x censurados	0,0103*
		<1 ano x >1 ano	0,0002*

Figura 14. Gráficos relacionando atipia nuclear com a sobrevida de animais com melanoma oral canino. A- Gráfico de correlação entre escore de atipia nuclear e sobrevida pós-cirúrgica ($p = 0.0008$, $r = -0.6153$), a reta demonstra uma tendência nos dados. B- Análise de sobrevida por Kaplan-Meier determinando o escore 4 como ponto de corte entre os grupos ($p = 0,0004$, mediana de sobrevida para grupo com alto grau de atipia = 173 dias, mediana de sobrevida para grupo com baixo grau de atipia = 486 dias).

4.3.2 Marcadores moleculares

Os resultados das expressões imuno-histoquímicas de Ki67, BCL2 e CASP3 por amostra estão demonstrados na Tabela 10. Os diferentes padrões de expressão de Ki67, de escores de intensidade de BCL2 e escores de porcentagem de CASP3 estão demonstrados nas figuras 15, 16 e 17 respectivamente.

Quadro 5. Valores de média da contagem da marcação nuclear de Ki67, escores de porcentagem e intensidade de marcação nuclear de BCL2 e escore de porcentagem de marcação citoplasmática de CASP3 em melanomas orais caninos.

Amostra	Contagem Ki67	Escore % BCL2	Escore Intensidade BCL2	Escore % CASP3
01	47,4	4	1	1
02	64	4	3	0
03	21	4	4	1
04	15,4	4	4	1
05	67,4	4	4	0
06	43,8	4	2	2
07	47,6	4	4	2
08	33,4	4	2	2
09	25	1	1	0
10	55	4	3	1
11	24,4	4	2	1
12	85,8	4	2	2
13	63,3	4	4	1
14	16	3	3	2
15	27	4	4	2
16	50,2	4	4	1
17	38,6	4	4	1
18	26,8	3	2	2
19	19,4	4	4	1
20	15,2	4	3	1
21	41,4	4	4	0
22	34,8	3	4	2
23	40,6	4	3	1
24	59,2	4	2	0
25	29	4	3	0
26	58,2	2	1	0
27	14,5	-	-	-

Figura 15. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação nuclear positiva de amostra com alta contagem de Ki67 ($\mu = 58,2$). B- Marcação nuclear positiva de amostra com baixa contagem de Ki67 ($\mu = 14,5$). Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Figura 16. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação citoplasmática positiva de amostra com baixa intensidade de BCL2; B- Marcação nuclear positiva de amostra com alta intensidade de BCL2. Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Figura 17. Fotomicrografias de melanomas orais caninos. A- Marcação citoplasmática de <1% das células neoplásicas (escore 1) de CASP3. B – Marcação citoplasmática de >1% das células neoplásicas (escore 2) de CASP3. Hematoxilina de Harris, objetiva de 40x.

Não obtivemos diferenças estatisticamente significantes para índice de Ki67, escores de porcentagem e intensidade de BCL2 e escores de porcentagem de CASP3 quando comparados os grupos: machos x fêmeas; tipo histológico epitelióide x misto; melanomas melânicos x amelanicos; óbito em função do tumor x censurados; e sobrevida maior que 1 ano x menor que 1 ano (Tabela 11). Não obtivemos correlações estatísticas entre as expressões de Ki67, BCL2 e CASP3 e a sobrevida pós-cirúrgica.

Tabela 6. Resultados dos testes estatísticos para comparações entre índice de Ki67, porcentagem de células marcadas e intensidade de marcação para BCL2 e escores para CASP3 *versus* variáveis de sexo, tipo histológico, grau de pigmentação, óbito em função do tumor e sobrevida maior que 1 ano e correlação com a sobrevida.

Marcador	Valor de p Sobrevida	Grupos comparados	Valores de p
Ki67	0,4830	Macho x Fêmea	0,5878
		Epitelioide x Misto	0,4645
		Melânico x Amelânico	0,3755
		Óbito tumor x censurados	0,1163
		<1 ano x >1 ano	0,7410
% BCL2	0,9212	Macho x Fêmea	0,0978
		Epitelioide x Misto	0,6361
		Melânico x Amelânico	0,7443
		Óbito tumor x censurados	0,6769
		<1 ano x >1 ano	0,6279
Intensidade BCL2	0,0803	Macho x Fêmea	0,5062
		Epitelioide x Misto	0,4840
		Melânico x Amelânico	0,4335
		Óbito tumor x censurados	0,7765
		<1 ano x >1 ano	0,0691
CASP3	0,3120	Macho x Fêmea	0,7288
		Epitelioide x Misto	0,7140
		Melânico x Amelânico	0,0602
		Óbito tumor x censurados	0,1238
		<1 ano x >1 ano	0,0975

Os resultados das análises de correlação entre os marcadores moleculares e parâmetros histopatológicos então descritos na Tabela 12. Não obtivemos correlação da expressão de Ki67, porcentagem de BCL2, intensidade de BCL2 e porcentagem de CASP3 entre si. Da mesma forma, não tivemos correlações entre estes marcadores com atipia nuclear, índice mitótico, grau de pigmentação e tipo histológico.

Tabela 7. Resultados dos testes de correlação dos marcadores imuno-histoquímicos (Ki67, BCL2 e CASP3) entre si e parâmetros histopatológicos (atipia nuclear, índice mitótico, grau de pigmentação e tipo histológico).

Marcador IHQ	Marcadores IHQ	p	Parâmetros HP	p
Ki67	Ki67	-	Atipia nuclear	0,0791
	% BCL2	0,3236	Índice Mitótico	0,0530
	Intensidade BCL2	0,6615	Grau de Pigmentação	0,3755
	CASP3	0,2614	Tipo histológico	0,4645
% BCL2	Ki67	0,3236	Atipia nuclear	0,6790
	% BCL2	-	Índice Mitótico	0,5655
	Intensidade BCL2	0,0740	Grau de Pigmentação	0,7443
	CASP3	0,8039	Tipo histológico	0,6361
Intensidade BCL2	Ki67	0,6615	Atipia nuclear	0,3541
	% BCL2	0,0740	Índice Mitótico	0,8192
	Intensidade BCL2	-	Grau de Pigmentação	0,4335
	CASP3	0,7333	Tipo histológico	0,4840
CASP3	Ki67	0,2614	Atipia nuclear	0,7880
	% BCL2	0,8039	Índice Mitótico	0,1824
	Intensidade BCL2	0,7333	Grau de Pigmentação	0,0602
	CASP3	-	Tipo histológico	0,7140

5. Discussão

A Gal-3 tem sido correlacionada com a sobrevida do paciente humano com câncer, sendo o aumento da expressão de Gal-3 associada ao avanço neoplásico e pior prognóstico em algumas neoplasias (BULJAN et al., 2011; MESQUITA et al., 2016; PUGLISI et al., 2004; SHIBATA et al., 2005; XIE et al., 2012) ou relacionada com estabilização tumoral e aumento na sobrevida em outras (BROWN et al., 2012; CHENG et al., 2011). Além disso, a Gal-3 tem sido relacionada com as principais características do câncer como a evasão da morte por apoptose (CALIFICE et al., 2004; MATARRESE et al., 2000;) e o aumento da proliferação celular (HONJO; NANGIA-MAKKER; INOHARA, 2001; SASAKI; BAO; HUGHES, 1999). Pouco se sabe sobre a expressão da Gal-3 em neoplasias caninas, tendo sido investigada principalmente em carcinomas mamários caninos (DE OLIVEIRA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2016). Garcia e Gomes (2017) publicaram a dissertação de mestrado avaliando a expressão das galectinas 1 e 3 em melanomas orais caninos.

Em cães, esta neoplasia é de grande preocupação clínica devido ao seu comportamento localmente agressivo, diagnóstico tardio, grande capacidade metastática e grande capacidade de recidiva (BERGMAN, 2007; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002). Como melanoma canino é um importante modelo de estudo para o melanoma humano (SIMPSON et al., 2014; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; VAN DER WEYDEN et al., 2016), os resultados deste trabalho podem servir de base para novos estudos na medicina comparada.

5.1 Avaliação da população estudada

Apesar de não termos realizado análise estatística relacionado a frequência racial, semelhante a observado por Ramos-Vara et al. (2000), encontramos maior frequência em raças como Cocker Spaniel, Poodle e Golden Retriever. Além disso, Ramos-Vara et al. (2000) destacaram outras raças como Gordon Setter, Chow Chow e cães sem raça definida. Da mesma forma, Rolim et al. (2012), descreveram uma população de animais que, em sua maioria, eram

sem raça definida, com números considerável de cães das raças Cocker Spaniel e Poodle. Esplin (2008) observou maior porcentagem de Golden Retriever e Labrador, enquanto que trabalhos de revisão mais antigos apresentam maior incidência para cães da raça Boxer e Pasto alemão (MACEWEN et al., 1986; SMITH; GOLDSCHMIDT; MCMANUS, 2002; TODOROFF; BRODEY, 1979). Esses estudos variam em quantidade de animais e país onde foram realizados, dificultando a comparação de resultados.

Acerca da faixa etária de acometimento dos animais, a idade média ao diagnóstico foi de 13 anos, sendo que 89% dos animais apresentavam idade igual ou superior a 10 anos. MacEwen et al. (1986) obtiveram uma média de 11 anos e Hahn et al. (1994) reportaram uma maioria de animais com mais de 10 anos de idade (75%). De modo semelhante, Kawabe et al (2015), Boston et al. (2014) e Koenig et al. (2002) encontraram os valores de 12,2, 12 e 12 anos de idade média, respectivamente. Podemos notar que, ao longo dos anos, a idade média de pacientes com neoplasias melanocíticas tem aumentado sendo este, provavelmente, um efeito do aprimoramento dos tratamentos e conscientização de proprietários no controle de neoplasias da cavidade oral (SPANGLER; KASS, 2006).

No que tange à predisposição sexual, obtivemos maior frequência em machos (67%), semelhante a outros estudos (DOBSON, 1994; DORN; PRIESTER, 1976; TODOROFF; BRODEY, 1979). Apesar disso, não encontramos diferenças significantes no que diz respeito à sobrevida pós-cirúrgica entre machos e fêmeas, corroborando os dados de literatura (ESPLIN, 2008; HAHN et al., 1994; MACEWEN et al., 1986; RAMOS-VARA et al., 2000; ROLIM et al., 2012; TODOROFF; BRODEY, 1979). Estudos complementares foram desenvolvidos com populações maiores e a frequência foi semelhante para machos e fêmeas (HAHN et al., 1994; MACEWEN et al., 1986; RAMOS-VARA et al., 2000; ROLIM et al., 2012; SPANGLER; KASS, 2006).

Encontramos maior frequência de melanomas orais na região de mandíbula e lábios (64%) corroborando as observações de Ramos-Vara et al. (2000), que encontraram 51% de lesões em região de mandíbula e lábio. Proulx, Ruslander e Hauck, (2003), por sua vez, encontraram mais casos de melanomas orais em região de maxila, assim como Hahn et al. (1994). Poucos estudos foram

encontrados definindo a localização da neoplasia dentro da cavidade oral, sendo mais comum citarem o tecido que as originaram, à saber gengiva, mucosas, palato, língua, tonsilas e faringe (BRODEY, 1970; MULLIGAN, 1961; RAMOS-VARA et al., 2000; SPANGLER; KASS, 2006; TODOROFF; BRODEY, 1979). Infelizmente, nossos dados clínicos não continham as informações necessárias para classificar a localização da neoplasia com a mesma precisão que estes trabalhos.

Na clínica, a maioria das neoplasias melanocíticas se apresenta como nódulos pigmentados e com acúmulo de pigmento melânico na microscopia, porém uma menor fração não contém pigmento algum, dificultando o diagnóstico e apresentando um comportamento biológico imprevisível (CHOI; KUSEWITT, 2003). No presente estudo, verificamos quantidades semelhantes de melanomas orais pigmentados (14/27) e não-pigmentados (13/27). Como nossas amostras foram obtidas de laboratórios especializados, que normalmente recebem encaminhamentos de outros clínicos/cirurgiões não-especializados, os casos recebidos possuem maior dificuldade diagnóstica (melanomas amelanocíticos), casos em que o resultado não pode ser determinado em exames de triagem como a citologia.

Para o desenvolvimento de um trabalho com melanomas amelanocíticos é imprescindível o diagnóstico imuno-histoquímico adequado, de forma a comprovar a histogênese. Todas as amostras incluídas no trabalho foram positivas para marcação do nosso coquetel imuno-histoquímico para melanoma (HMB45 + Melan-A + Tirosinase), tendo maiores taxas de sensibilidade e mantendo especificidade dos marcadores (KOENIG et al., 2001; RAMOS-VARA et al., 2000; SMEDLEY et al., 2011; SULAIMON; KITCHELL, 2003).

O grau de pigmentação das neoplasias melanocíticas foi amplamente estudado, mas na maioria das vezes foi determinado por meio de análises subjetivas ou semiquantitativas (BERGIN et al., 2011). Em nosso trabalho, optamos por uma metodologia objetiva de presença ou ausência de melanina para evitar variáveis subjetivas. Não encontramos diferenças na sobrevida de cães com melanomas orais melânicos em comparação aos amelanocíticos. De modo semelhante, outras pesquisas apontam que o grau de pigmentação não tem relação com a sobrevida pós-cirúrgica dos pacientes com melanoma oral

(BOSTOCK, 1979; HAHN et al., 1994; HARVEY et al., 1981; RAMOS-VARA et al., 2000; SCHULTHEISS, 2006) e, ao contrário do que se imagina, a incapacidade das células em produzir melanina não está necessariamente relacionadas com pior prognóstico (BERGIN et al., 2011).

O tipo histológico é outra característica histomorfológica amplamente estudada, porém carece de correlação com a sobrevida, corroborando nossos resultados (BOSTOCK, 1979; HAHN et al., 1994; LAPRIE et al., 2001; MILLANTA et al., 2002; ROELS; TILMANT; DUCATELLE, 2001; SPANGLER; KASS, 2006). Alguns estudos correlacionaram o tipo histológico com o comportamento maligno das neoplasias melanocíticas, porém sem associar com a sobrevida dos animais (BOSTOCK, 1979; MILLANTA et al., 2002). As neoplasias mistas, compostas por células fusiformes e epitelioides, foram nossa maior casuística, seguidas das simples epitelioides. Não obtivemos casos de neoplasias fusiformes. Nossos resultados corroboram com Ramos-Vara et al. (2000) apresentando tumores mistos como mais frequentes, seguido por epitelioides e fusiformes. Já Hahn et al. (1994) e Spangler e Kass (2006) obtiveram maior frequência de neoplasias epitelioides, seguidas das mistas e fusiformes.

5.2 Análise semiquantitativa da expressão de Gal-3

Pacientes que sobreviveram por menos 1 ano após cirurgia apresentaram menor expressão de Gal-3 quando comparados aos animais que viveram por mais de 1 ano após a intervenção cirúrgica. A expressão geral de Gal-3 (citoplasma + núcleo) teve correlação positiva com a sobrevida pós-cirúrgica, enquanto que a expressão nuclear foi correlacionada com menores tempos de sobrevida dos pacientes com melanoma oral. De maneira semelhante, Garcia e Gomes (2017) demonstraram que houve maior frequência da expressão de Gal-3 no citoplasma de neoplasias menos agressivas e maior intensidade da expressão nuclear em neoplasias mais agressivas.

A espessura dos melanomas humanos é considerada um fator prognóstico (BRESLOW, 1970). Uma série de estudos demonstraram maior expressão de Gal-3 citoplasmática associada a nevos benignos e melanomas

finos, apesar de não serem comparados com a sobrevida (ABDOU et al., 2010; BULJAN et al., 2011; PRIETO et al., 2006; VEREECKEN et al., 2005). Já Brown et al. (2012) evidenciaram que a maior expressão citoplasmática da Gal-3 está relacionada com nevos benignos e melanomas finos, neoplasias com melhor prognóstico em humanos. Quando avaliados melanomas mais espessos e metástases, por outro lado, notaram uma queda na expressão proteica da Gal-3 no citoplasma. A diminuição e supressão da expressão de Gal-3 foi encontrada e relacionada à progressão em cânceres de pele não-melanoma, carcinomas mamários e endometriais, tumores de próstata, e leucemias linfocíticas crônicas (CASTRONOVO et al., 1996; CHENG et al., 2011; KAPUCUOGLU et al., 2009; WANG et al., 2009).

A presença da Gal-3 no citoplasma é bem documentada há muito tempo, mas ainda muito deve ser estudado para compreensão de suas funções por completo. A primeira molécula identificada como ligante citoplasmático da Gal-3 *in vivo* é a proteína antiapoptótica BCL2 (YANG; HSU; LIU, 1996). Em nosso estudo, demonstramos uma correlação entre a expressão da Gal-3 com a expressão de BCL2. Foi sugerido que a Gal-3 se liga à BCL2 através do CRD, auxiliando na função de estabilização da membrana mitocondrial, impedindo assim liberação da citocromo C e consequente apoptose (MATARRESE et al., 2000; YU et al., 2002). A Gal-3 apresenta 28% de identidade e 48% similaridade com BCL2, tendo motivos NWGR semelhantes, importantes para atividade antiapoptótica de ambas proteínas (AKAHANI et al., 1997). A Gal-3 citoplasmática interage com sinexinas, proteínas cálcio dependentes e ligante de fosfolipídios, permitindo a translocação da Gal-3 para a mitocôndria. É sabido que BCL2 atua na membrana mitocondrial na forma de homodímeros, impedindo a liberação da citocromo C. Por compartilhar domínios com BCL2, a Gal-3 é capaz de se ligar à mesma formando heterodímeros que irão desempenhar a mesma função antiapoptótica (YANG; HSU; LIU, 1996). A evasão da morte por apoptose é uma das características importantes do câncer, porém encontramos que as maiores expressões de Gal-3 no citoplasma, estão relacionadas com neoplasias menos agressivas, ou seja, com maior sobrevida pós-cirúrgica. A expressão de CASP3, proteína terminal da cascata de apoptose, não apresentou correlação com a sobrevida, mas notamos maior expressão de CASP3 em

neoplasias com maior sobrevida, mostrando que mesmo com as presenças da Gal-3 e de BCL2 no citoplasma, ainda está ocorrendo apoptose de células tumorais. Uma das hipóteses, é uma possível ausência de sinexinas que fazem a translocação da Gal-3 para a membrana mitocondrial e impedem sua função (HSU et al., 1996). A avaliação da expressão de sinexinas deve ser realizada para melhor compreensão do papel da Gal-3 no citoplasma de melanócitos malignos. Outra hipótese é a possibilidade de ocorrer uma mutação com perda da função da proteína em BCL2. Nosso anticorpo anti-BCL2 reconhece como epítipo a porção N-terminal desta proteína, sendo possível que ocorra mutações de perda de função ao longo de toda estrutura proteica.

O histoscore e o resultado qualitativo (alto grau x baixo grau) de expressão da Gal-3 também apresentaram correlação com a intensidade de BCL2, por serem parâmetros que levam em consideração a porcentagem de expressão de Gal-3. No que se refere à análise de sobrevida dos escores de expressão geral (nuclear e citoplasmática) de Gal-3, não obtivemos diferenças significantes quando determinamos os pontos de cortes dos escores (25% e 50%), dessa forma procedemos a uma análise quantitativa, por meio da contagem de células positivas para Gal-3.

Ainda no citoplasma, a Gal-3 atua de maneira distinta na proliferação celular, de acordo com o tipo de célula-alvo. Esta proteína parece se ligar seletivamente ao K-Ras ativado, iniciando uma rede de cascatas responsável pela proliferação celular (ELAD-SFADIA et al., 2004), com estimulação final da ciclina D1 e c-myc (SHIMURA et al., 2004). A expressão de Gal-3 não apresentou correlação com a de Ki67, mas o valor de r obtido sugere uma relação inversa entre os dois. A análise de um número maior de casos pode futuramente esclarecer se a Gal-3 possui influências no sentido de induzir a parada do ciclo celular em melanomas orais caninos.

No que se refere à expressão nuclear da Gal-3, Prieto et al. (2006) mostraram que houve alta expressão nuclear de Gal-3 em melanomas que metastáticos e que são mais expostos a raios UV. Ao contrário, Brown et al. (2012) que encontraram maior expressão nuclear em pacientes com melhor prognóstico, assim como Shibata et al. (2005) observaram correlação negativa com invasão vascular e diferenciação histológica em carcinomas de células

escamosa do esôfago. Em adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas do pulmão, o aumento da expressão nuclear da Gal-3 foi considerada um fator preditivo independente (MATHIEU et al., 2005). Puglisi et al. (2004) mostraram que a expressão nuclear a Gal-3 estava associado a um pior prognóstico em carcinomas mamários. A translocação nuclear da Gal-3 foi correlacionada com metástase peritoneais em carcinomas gástricos (YANG et al., 2006).

Quando encontrada no núcleo, a Gal-3 está associada com proteínas ribossomais, atuando como um fator de *splicing* pré-RNA, através da proteína Gemin4 (DAGHER; WANG; PATTERSON, 1995; PARK et al., 2001). Além disso, tem a capacidade de se ligar a sítios de promoção CRE e Sp1, encontrados nas ciclinas D1, A e E, regulando o ciclo celular em G1-S (KIM et al., 1999). Não encontramos correlação significativa entre a expressão de Gal-3 nuclear e Ki67. Apesar disso, o valor de *r* foi negativo, sugerindo maior expressão nuclear em células que proliferavam menos, indicando uma possível parada no ciclo celular auxiliada pela Gal-3. Mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

5.3 Análise quantitativa da expressão de Gal-3

Ao compararmos a contagem de núcleos positivos entre os grupos de gênero (machos e fêmeas) e tipo histológicos (epitelioides e mistos), notamos diferenças estatísticas entre os grupos. Com relação ao sexo, uma das hipóteses do nosso grupo, é uma relação hormonal na translocação da Gal-3 para o núcleo celular. Já as diferenças entre tipo histológico podem ter relação com a morfologia celular, sendo maior a expressão da Gal-3 nuclear em células epitelioides. Deve-se ter cautela a analisar esses dados devido ao baixo número de amostras no estudo e entre grupos (ex: apenas 4 tumores epitelioides). No que se refere às demais análises de comparações, de correlações e sobrevida, não encontramos diferenças significantes para contagem de células (citoplasma e núcleo) e para contagem de núcleos positivos para Gal-3. Em nosso estudo estabelecemos dois métodos de análise da imunomarcação de Gal-3: escores semiquantitativos para intensidade e porcentagem de células marcadas,

avaliando a totalidade da área tumoral, e a contagem/quantificação, realizada em cinco *hot spots*. Na literatura, grande parte dos trabalhos utiliza a metodologia de escores e histoscore para determinar a expressão da Gal-3 com pequenas variações entre eles (BROWN et al., 2012; BULJAN et al., 2011; CHENG; DONG; LUO, 2004; JIANG et al., 2014; XIE et al., 2012; ZHOU et al., 2014). A partir desta metodologia obtivemos diferenças significantes e baseamos nossas conclusões. Já a avaliação por contagem de células marcadas em *hot spots* é menos frequente para esta proteína. Isso se deve ao fato de que a expressão da Gal-3 não seja homogênea por todo o tecido.

5.4 Análise de parâmetros histopatológicos

No que se refere aos parâmetros histopatológicos, obtivemos diferenças entre os grupos de óbito em função do tumor e censurados, e entre sobrevivência pós-cirúrgica maior que 1 ano e menor que 1 ano para os escores de atipia nuclear. Não obtivemos diferenças estatística para esses grupos com relação a Ki67, índice mitótico, expressão de BCL2 e CASP3. Com base nas análises de correlações, estabelecemos uma correlação moderada e negativa da atipia nuclear com sobrevivência dos animais. Os demais marcadores prognósticos (Ki67 e índice mitótico) e apoptóticos (BCL2 e CASP3) não apresentaram correlação com a sobrevivência. Ao procedermos a análise de sobrevivência, estabelecemos ponto de corte no escore 4, semelhante a Spangler e Kass (2006), e notamos diferenças nas curvas de sobrevivência nos dois grupos, mostrando que a atipia nuclear é um importante marcador prognóstico para melanomas orais caninos.

Nossos resultados, no que se refere à atipia nuclear, corroboram os de outros estudos que utilizam essa ferramenta prognóstica (BERGIN et al., 2011; SMEDLEY et al., 2011a; SPANGLER; KASS, 2006). Apesar de ser um parâmetro subjetivo, uma padronização da técnica e uma rigorosa descrição realizada por Spangler e Kass (2006) auxiliaram na avaliação adequada. Sánchez et al. (2007) não viram correlação da atipia nuclear com recorrência de metástases em melanomas com diferenciação osteocartilaginosa, porém os próprios autores citam o número reduzido de amostras como viés da análise.

6. Conclusões

- Apesar da expressão de Galectina-3 ter correlação com a sobrevida pós-cirúrgica de cães com melanoma oral, a Galectina-3 não pode ser considerada um marcador prognóstico.
- Há correlação na expressão de Galectina-3 e BCL2 em melanomas orais caninos.
- A atipia nuclear é um importante marcador prognóstico em melanomas orais caninos.

7. Referências Bibliográficas

ABDOU, A. G. et al. Diagnostic and Prognostic Role of Galectin 3 Expression in Cutaneous Melanoma. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 32, n. 8, p. 809–814, dez. 2010.

AKAHANI, S. et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer research**, v. 57, n. 23, p. 5272–6, 1 dez. 1997.

ARGYLE, D. J.; BLACKING, T. From viruses to cancer stem cells: Dissecting the pathways to malignancy. v. 177, p. 311–323, 2008.

ATHERTON, M. J.; LICHTY, B. D. Evolution of oncolytic viruses: novel strategies for cancer treatment. **Immunotherapy**, v. 5, n. 11, p. 1191–1206, 2013.

BABA, A. I.; CÂTOI, C. EPITHELIAL AND MELANOCYTIC TUMORS OF THE SKIN. 2007.

BAO, Q.; HUGHES, R. C. Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro. **Journal of cell science**, v. 108 (Pt 8, p. 2791–800, ago. 1995.

BARBONI, E. A. et al. Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. **Glycobiology**, v. 10, n. 11, p. 1201–8, nov. 2000.

BARKER, B. F. et al. Oral mucosal melanomas: the WESTOP Banff workshop proceedings. Western Society of Teachers of Oral Pathology. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 83, n. 6, p. 672–9, jun. 1997.

BATEMAN, K. E. et al. 0-7-21 radiation therapy for the treatment of canine oral melanoma. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 8, n. 4, p. 267–72, jan. 1994.

BEATTY, W. L. et al. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 3,

p. 167–76, mar. 2002.

BERGIN, I. L. et al. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 41–53, jan. 2011.

BERGMAN, P. J. et al. Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 1284–1290, 2003.

BERGMAN, P. J. et al. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. **Vaccine**, v. 24, n. 21, p. 4582–4585, 2006.

BERGMAN, P. J. Canine Oral Melanoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 22, n. 2, p. 55–60, 2007.

BERRINGTON, A. J.; JIMBOW, K.; HAINES, D. M. Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. **Veterinary pathology**, v. 31, n. 4, p. 455–61, 26 jul. 1994.

BERTOY, R. W.; BRIGHTMAN, A. H.; REGAN, K. Intraocular melanoma with multiple metastases in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 1, p. 87–9, 1 jan. 1988.

BIANCO, S. R. et al. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. **Cancer Gene Therapy**, v. 10, n. 9, p. 726–736, set. 2003.

BOLON, B.; CALDERWOOD MAYS, M. B.; HALL, B. J. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. **Veterinary pathology**, v. 27, n. 2, p. 96–102, mar. 1990.

BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 14, n. 1, p. 27–40, 1 jan. 1973.

BOSTON, S. E. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001-2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 4, p. 401–7, 2014.

BOURGUET, A. et al. A case of primary choroidal malignant melanoma in a cat. **Veterinary Ophthalmology**, v. 18, n. 4, p. 345–349, jul. 2015.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of surgery**, v. 172, n. 5, p. 902–908, 1970.

BROCKLEY, L. K.; COOPER, M. A.; BENNETT, P. F. Malignant melanoma in 63 dogs (2001-2011): The effect of carboplatin chemotherapy on survival. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 25–31, 2013.

BRODEY, R. S. The biological behaviour of canine oral and pharyngeal neoplasms. **The Journal of small animal practice**, v. 11, n. 1, p. 45–53, jan. 1970.

BROWN, E. R. et al. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 6, p. 865–874, 2012.

BULJAN, M. et al. Prognostic value of galectin-3 in primary cutaneous melanoma. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 25, p. 1174–81, 2011.

BUONAGURO, L. et al. Translating tumor antigens into cancer vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 1, p. 23–34, 2011.

BUSAM, K. J. et al. Immunohistochemical analysis of novel monoclonal antibody PNL2 and comparison with other melanocyte differentiation markers. **The American journal of surgical pathology**, v. 29, n. 3, p. 400–6, mar. 2005.

CALIFICE, S. et al. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene**, v. 23, n. 45, p. 7527–7536, 30 set. 2004.

CANELLA, K. A. et al. **Liver tumorigenesis by Helicobacter hepaticus: Considerations of mechanism** *In Vivo*, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797029>>. Acesso em: 4 out. 2017

CAO, Z. et al. Galectins-3 and -7, but not galectin-1, play a role in re-epithelialization of wounds. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 44,

p. 42299–305, 1 nov. 2002.

CASTRONOVO, V. et al. Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. **J. Pathol.**, v. 179, n. 1, p. 43–48, 1996.

CHEN, C. et al. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 7, 2013.

CHEN, Y. T. et al. Serological analysis of Melan-A(MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5915–9, 11 jun. 1996.

CHENG, C.; DONG, W.; LUO, H. EXPRESSION OF GALECTIN-3 AND ITS SIGNIFICANCE IN GASTRIC CARCINOMA. v. 16, n. May 2003, p. 176–181, 2004.

CHENG, Y.-S.; KUO, S.-J.; CHEN, D.-R. Sparing sentinel node biopsy through axillary lymph node fine needle aspiration in primary breast cancers. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 1, p. 296, 20 nov. 2013.

CHENG, Y. L. et al. Increased galectin-3 facilitates leukemia cell survival from apoptotic stimuli. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, n. 2, p. 334–340, 2011.

CHOISUNIRACHON, N. et al. Effects of low-dose cyclophosphamide with piroxicam on tumour neovascularization in a canine oral malignant melanoma-xenografted mouse model. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 13, n. 4, p. 424–432, 2015.

CHONG, H.; VIKIS, H. G.; GUAN, K.-L. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. **Cellular signalling**, v. 15, n. 5, p. 463–9, maio 2003.

CLARKSON, K. S.; STURDGESS, I. C.; MOLYNEUX, A. J. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). **Journal of clinical pathology**, v. 54, n. 3, p. 196–200, mar. 2001.

COLNOT, C. et al. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology**, v. 94, n. 3, p. 290–6, jul. 1998.

COLNOT, C. et al. Cellular and subcellular distribution of galectin-3 in the epiphyseal cartilage and bone of fetal and neonatal mice. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 45, n. 8, p. 1191–202, dez. 1999.

COLOMBO, S. et al. **Classical and Nonclassical Melanocytes in Vertebrates**. [s.l: s.n.].

CONROY, J. D. Melanocytic Tumors of Domestic Animals. **Archives of Dermatology**, v. 96, n. 4, p. 372, 1 out. 1967.

COTCHIN, E. Melanotic tumours of dogs. **Journal of comparative pathology**, v. 65, n. 2, p. 115–29, abr. 1955.

COULIE, P. G. et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 35–42, 1 jul. 1994.

CULP, W. T. N. et al. Results of surgical excision and evaluation of factors associated with survival time in dogs with lingual neoplasia: 97 cases (1995–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 10, p. 1392–1397, 2013.

D'HAENE, N. et al. The differential expression of galectin-1 and galectin-3 in normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 18, n. 3, p. 431–443, 2005.

D'HAENE, N. et al. Endothelial hyperplasia and endothelial galectin-3 expression are prognostic factors in primary central nervous system lymphomas. **British journal of haematology**, v. 140, n. 4, p. 402–10, fev. 2008.

D'HAENE, N. et al. VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67029, 2013.

D'MELLO, S. A. N. et al. Signaling pathways in melanogenesis. **International**

Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 7, p. 1–18, 2016.

DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–7, 14 fev. 1995.

DANK, G. et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 12, n. 1, p. 78–84, 2014.

DASKALOV, I.; MUDROV, N.; PEYCHEVA, E. Exploring new instrumentation parameters for electrochemotherapy: Attacking tumors with bursts of biphasic pulses instead of single pulses. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 18, n. 1, p. 62–66, 1999.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 27 jun. 2002.

DE OLIVEIRA, J. T. et al. Coordinated expression of galectin-3 and galectin-3-binding sites in malignant mammary tumors: Implications for tumor metastasis. **Glycobiology**, v. 20, n. 11, p. 1341–1352, 2010.

DEBRAY, C. et al. Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 4, p. 1393–1398, 2004.

DEWEY, D., L. Radiosensitivity of Melanoma Cells in Culture. **British Journal of Radiology**, v. 44, p. 816–817, 1971.

DOBSON, J. Skin Tumours of the Dog and Cat By M. H. Goldschmidt and F. S. Shofer. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 6, p. 325–325, jun. 1994.

DORN, C. R.; PRIESTER, W. A. Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 11, p. 1202–6, 1 dez. 1976.

DUMIC, J.; DABELIC, S.; FLÖGEL, M. Galectin-3: An open-ended story. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1760, n. 4, p. 616–635, 2006.

EASTHAM, J. A. et al. In vivo gene therapy with p53 or p21 adenovirus for prostate cancer. **Cancer research**, v. 55, n. 22, p. 5151–5, 15 nov. 1995.

EL-NAGGAR, A. K. et al. Clear cell sarcomas and metastatic soft tissue melanomas. A flow cytometric comparison and prognostic implications. **Cancer**, v. 67, n. 8, p. 2173–9, 15 abr. 1991.

ELAD-SFADIA, G. et al. Galectin-3 augments K-ras activation and triggers a ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34922–34930, 2004.

ELLERHORST, J. A. et al. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. **The Prostate**, v. 50, n. 1, p. 64–70, 1 jan. 2002.

ENDO, K. et al. Galectin-3 expression is a potent prognostic marker in colorectal cancer. **Anticancer research**, v. 25, n. 4, p. 3117–21, jan. 2005.

ESPLIN, D. G. Survival of dogs following surgical excision of histologically well-differentiated melanocytic neoplasms of the mucous membranes of the lips and oral cavity. **Veterinary pathology**, v. 45, n. 6, p. 889–96, 1 nov. 2008.

FERNÁNDEZ, G. C. et al. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. **Glycobiology**, v. 15, n. 5, p. 519–27, 1 maio 2005.

FETSCH, P. A. et al. Melanoma-associated antigen recognized by T cells (MART-1): the advent of a preferred immunocytochemical antibody for the diagnosis of metastatic malignant melanoma with fine-needle aspiration. **Cancer**, v. 87, n. 1, p. 37–42, 25 fev. 1999.

FETSCH, P. A. et al. Tyrosinase immunoreactivity in fine-needle aspiration samples of metastatic malignant melanoma. **Cancer**, v. 90, n. 4, p. 252–7, 25 ago. 2000.

FEUK-LAGERSTEDT, E. et al. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 10, p. 5592–8, 1999.

FLOTTE, T. J.; SPRINGER, T. A.; THORBECKE, G. J. Dendritic cell and

macrophage staining by monoclonal antibodies in tissue sections and epidermal sheets. **The American journal of pathology**, v. 111, n. 1, p. 112–24, abr. 1983.

FOLPE, A. L. et al. Perivascular epithelioid cell neoplasms of soft tissue and gynecologic origin: a clinicopathologic study of 26 cases and review of the literature. **The American journal of surgical pathology**, v. 29, n. 12, p. 1558–75, dez. 2005.

FOX, L. et al. Owner satisfaction with partial mandibulectomy or maxillectomy for treatment of oral tumors in 27 dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 33, n. 1, p. 25–31, 28 jan. 1997.

FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in Cancer Biology**, v. 27, p. 30–38, 2014a.

FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. **Glycobiology**, v. 24, n. 10, p. 886–891, 2014b.

GARCIA, J. S.; GOMES, C. DE O. M. S. Avaliação da expressão das galectinas no melanoma canino. **Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, 2017.

GARMA-AVIÑA, A.; VALLI, V. E.; LUMSDEN, J. H. Cutaneous Melanomas in Domestic Animals. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 8, n. 1, p. 3–24, 1981.

GARTEL, A. L.; SERFAS, M. S.; TYNER, A. L. p21--negative regulator of the cell cycle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 213, n. 2, p. 138–49, nov. 1996.

GHAZI, J. Melanoma Arising in Burn Scars: Report of 3 Observations and a Literature Review. **Archives of Dermatology**, p. 705–706, 2011.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment cell & melanoma research**, v. 27, n. 1, p. 90–102, jan. 2014.

GOLDSCHMIDT, M. H. Benign and malignant melanocytic neoplasms of domestic animals. **The American Journal of dermatopathology**, v. 7 Suppl, p.

203–12, jan. 1985.

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

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2008. p. 45–117.

GONG, H. C. et al. The NH2 terminus of galectin-3 governs cellular compartmentalization and functions in cancer cells. **Cancer research**, v. 59, n. 24, p. 6239–45, 15 dez. 1999.

GORDON, I. et al. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. **PLoS medicine**, v. 6, n. 10, p. e1000161, out. 2009.

GORLIN, R. J. et al. The oral and pharyngeal pathology of domestic animals. A study of 487 cases. **American Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 79, p. 1032–1061, 1959.

GOUBIER, A. et al. Superiority of needle-free transdermal plasmid delivery for the induction of antigen-specific IFN γ T cell responses in the dog. **Vaccine**, v. 26, n. 18, p. 2186–2190, 2008.

GOWN, A. M. et al. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. **The American journal of pathology**, v. 123, n. 2, p. 195–203, maio 1986.

GRANTER, S. R. et al. Role for microphthalmia transcription factor in the diagnosis of metastatic malignant melanoma. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM**, v. 10, n. 1, p. 47–51, mar. 2002.

GREEN, A. et al. An Animal Model for Human Melanoma. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 3, p. 577–580, set. 1996.

GROSENBAUGH, D. A. et al. Safety and efficacy of a xenogeneic DNA vaccine encoding for human tyrosinase as adjunctive treatment for oral malignant melanoma in dogs following surgical excision of the primary tumor. **American Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 12, p. 1631–1638, 2011.

GUPTA, S. K. et al. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide binds galectin-3 and other human corneal epithelial proteins. **Infection and immunity**, v. 65, n. 7, p. 2747–53, jul. 1997.

HAASS, N. K. et al. Differential induction of connexins 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 54, n. 2, p. 171–82, fev. 2006.

HAGEMANN, C.; RAPP, U. R. Isotype-Specific Functions of Raf Kinases. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p. 34–46, 25 nov. 1999.

HAHN, K. A. et al. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. **Journal of Small Animal Practice**, v. 35, n. 5, p. 251–256, maio 1994.

HALL, B. J. et al. Fine-Needle Aspiration Cytology for the Diagnosis of Metastatic Melanoma: Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 140, n. 5, p. 635–642, 1 nov. 2013.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARVEY, H. J. et al. Prognostic criteria for dogs with oral melanoma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 6, p. 580–2, 15 mar. 1981.

HEILMANN, S. et al. Immunohistochemical distribution of galectin-1, galectin-3, and olfactory marker protein in human olfactory epithelium. **Histochemistry and cell biology**, v. 113, n. 3, p. 241–5, mar. 2000.

HIRABAYASHI, J.; KASAI, K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology**, v. 3, n. 4, p. 297–304, ago. 1993.

HOFBAUER, G. F. et al. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution.

Journal of cutaneous pathology, v. 25, n. 4, p. 204–9, abr. 1998.

HONJO, Y.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H. Down-Regulation of Galectin-3 Suppresses Tumorigenicity of Human Breast Carcinoma Cells. v. 7, n. March, p. 661–668, 2001.

HOOK, R. R. et al. Melanoma: Sinclair swine melanoma. **The American journal of pathology**, v. 108, n. 1, p. 130–3, jul. 1982.

HOYER, K. K. et al. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. **The American journal of pathology**, v. 164, n. 3, p. 893–902, mar. 2004.

HRDLICKOVÁ-CELA, E. et al. Detection of galectin-3 in tear fluid at disease states and immunohistochemical and lectin histochemical analysis in human corneal and conjunctival epithelium. **The British journal of ophthalmology**, v. 85, n. 11, p. 1336–40, nov. 2001.

HSU, D. K. et al. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 5, p. 1661–70, maio 1996.

HSU, D. K. et al. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 3, p. 1073–83, mar. 2000a.

HSU, M. Y. et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1515–25, maio 2000b.

INOHARA, H. et al. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. **Cancer research**, v. 56, n. 19, p. 4530–4, 1 out. 1996.

INOHARA, H.; AKAHANI, S.; RAZ, A. Galectin-3 Stimulates Cell Proliferation. **Experimental Cell Research**, v. 245, n. 2, p. 294–302, 15 dez. 1998.

IURISCI, I. et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 4, p. 1389–93, abr. 2000.

JACOBS, R.; MESSICK, J.; VALLI, V. Tumors in Domestic Animals, 4th Edition. In: **Tumors in Domestic Animals**. [s.l.] University of California Press, 2008. p. 119–198.

JIANG, S.-S. et al. Galectin-3 is associated with a poor prognosis in primary hepatocellular carcinoma. **Journal of translational medicine**, v. 12, p. 273, 27 set. 2014.

JOHNSON, P. J. Dermatologic tumors (excluding sarcoids). **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 14, n. 3, p. 625–58, viii, dez. 1998.

JOO, H. G. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 69, n. 4, p. 555–64, abr. 2001.

JUNGBLUTH, A. A. et al. T311--an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. **Pathology, research and practice**, v. 196, n. 4, p. 235–42, jan. 2000.

KAPUCUOGLU, N. et al. Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers. **Pathology Research and Practice**, v. 205, n. 2, p. 97–103, 2009.

KARLSSON, A. et al. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood**, v. 91, n. 9, p. 3430–8, 1 maio 1998.

KAUFMANN, O. et al. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 11, n. 8, p. 740–6, ago. 1998a.

KAUFMANN, O. et al. Tyrosinase, melan-A, and KBA62 as markers for the immunohistochemical identification of metastatic amelanotic melanomas on paraffin sections. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 11, n. 8, p. 740–6, ago. 1998b.

KAWABE, M. et al. Outcomes of dogs undergoing radiotherapy for treatment of oral malignant melanoma: 111 cases (2006–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 247, n. 10, p. 1146–1153, 2015.

KAWAHARA, A. et al. Fine needle aspiration cytology of metastatic polymorphous low-grade adenocarcinoma of the palate in a cervical lymph node. **Cytopathology**, v. 24, n. 1, p. 63–65, fev. 2013.

KAWAKAMI, Y. et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 1, p. 347–52, 1 jul. 1994.

KAWAKAMI, Y. et al. Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1. **Journal of immunological methods**, v. 202, n. 1, p. 13–25, 10 mar. 1997.

KAY, P. A. et al. Desmoplastic melanoma of the head and neck: histopathologic and immunohistochemical study of 28 cases. **International journal of surgical pathology**, v. 12, n. 1, p. 17–24, 27 jan. 2004.

KHANNA, C. et al. Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 18, p. 5671–7, 15 set. 2009.

KIM, H. R. et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer research**, v. 59, n. 16, p. 4148–54, 15 ago. 1999.

KIM, S.-J. et al. Ablation of galectin-3 induces p27KIP1-dependent premature senescence without oncogenic stress. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 11, p. 1769–1779, 2014.

KOENIG, A. et al. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. **Veterinary pathology**, v. 39, n. 4, p. 458–72, 26 jul. 2002.

KOH, H. K. Cutaneous Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 3, p. 171–182, 18 jul. 1991.

KÖRNER, A.; PAWELEK, J. Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 217, n. 4565, p. 1163–

5, 17 set. 1982.

KRUGLUGER, W. et al. Galectin-3 inhibits granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-driven rat bone marrow cell proliferation and GM-CSF-induced gene transcription. **Immunobiology**, v. 197, n. 1, p. 97–109, jun. 1997.

KUNZE, D. J. et al. Malignant melanoma of the coronary band in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, n. 3, p. 297–8, 1 fev. 1986.

KUWABARA, I.; LIU, F. T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 156, n. 10, p. 3939–44, 15 maio 1996.

LADUE, T.; KLEIN, M. K. Toxicity Criteria of the Veterinary Radiation Therapy Oncology Group. **Veterinary Radiology**, v. 42, n. 5, p. 475–476, 2001.

LAMOREUX, M. L.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Interaction of Major Coat Color Gene Functions in Mice as Studied by Chemical Analysis of Eumelanin and Pheomelanin. **Pigment Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 23–31, 1 fev. 2001.

LANGENBACH, A. et al. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1424–1428, 1 maio 2001.

LAPRIE, C. et al. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n. 3, p. 139–147, jun. 2001.

LEVENE, A. Equine melanotic disease. **Tumori**, v. 57, n. 3, p. 133–68, abr. 1971.

LI, G.; HERLYN, M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. **Molecular Medicine Today**, v. 6, n. 4, p. 163–169, abr. 2000.

LIU, F. T. et al. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 1016–28, out. 1995.

LIU, L. et al. Nucling mediates apoptosis by inhibiting expression of galectin-3 through interference with nuclear factor kappaB signalling. **The Biochemical journal**, v. 380, n. Pt 1, p. 31–41, 15 maio 2004.

LOTAN, R. et al. Expression of galectins on microvessel endothelial cells and their involvement in tumour cell adhesion. **Glycoconjugate journal**, v. 11, n. 5, p. 462–8, out. 1994.

LOTZ, M. M. et al. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3466–70, 15 abr. 1993.

MACEWEN, E. G. et al. Canine oral melanoma: comparison of surgery versus surgery plus *Corynebacterium parvum*. **Cancer investigation**, v. 4, n. 5, p. 397–402, jan. 1986.

MACHADO, C. M. L. et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF β 1-induced macrophages. **Cancer medicine**, v. 3, n. 2, p. 201–14, abr. 2014.

MACLEOD, K. F. et al. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. **Genes & development**, v. 9, n. 8, p. 935–44, 15 abr. 1995.

MÄHLMANN, K. et al. Local and systemic effect of transfection-reagent formulated DNA vectors on equine melanoma. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 132, 11 dez. 2015.

MANDRELL, R. E. et al. Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. **Methods in enzymology**, v. 236, p. 231–54, 1994.

MARINO, D. J. et al. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 6, p. 726–8, 15 set. 1995.

MARKOWSKA, A. I.; JEFFERIES, K. C.; PANJWANI, N. Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial Growth

factor receptor 2 in human endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29913–29921, 2011.

MARKOWSKA, A. I.; LIU, F.-T.; PANJWANI, N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 9, p. 1981–93, 30 ago. 2010.

MARKS, M. S.; SEABRA, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 10, p. 738–48, 2001.

MATARRESE, P. et al. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. **FEBS Letters**, v. 473, n. 3, p. 311–315, 2000.

MATHIEU, A. et al. Nuclear galectin-3 expression is an independent predictive factor of recurrence for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, n. 9, p. 1264–71, 8 set. 2005.

MEIER, F. et al. Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 3, p. D1005-10, 15 set. 1998.

MELEO, K. A. Tumors of the skin and associated structures. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 27, n. 1, p. 73–94, jan. 1997.

MENON, R. P.; HUGHES, R. C. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. **European journal of biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 569–76, set. 1999.

MENTZEL, T. et al. Cutaneous clear cell myomelanocytic tumour: a new member of the growing family of perivascular epithelioid cell tumours (PEComas). Clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven cases. **Histopathology**, v. 46, n. 5, p. 498–504, maio 2005.

MESQUITA, J. A. et al. Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma

in young patients. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 1, p. 237–243, 2016.

MEUTEN, D.; HEAD, KW; ELSE, RW; DUBIELZIG, R. **Tumors in Domestic Animals**. Ames, Iowa, USA: Iowa State Press, 2002.

MEY, A. et al. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 156, n. 4, p. 1572–7, 15 fev. 1996.

MIETTINEN, M. et al. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. **The American journal of surgical pathology**, v. 25, n. 2, p. 205–11, fev. 2001.

MIETTINEN, M.; FRANSSILA, K. Immunohistochemical spectrum of malignant melanoma. The common presence of keratins. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 61, n. 6, p. 623–8, dez. 1989.

MILLANTA, F. et al. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: Correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 1, p. 45–51, 2002.

MILLER, M. A. et al. Cutaneous melanocytomas in 10 young cattle. **Veterinary pathology**, v. 32, n. 5, p. 479–84, 26 set. 1995.

MILLINGTON, G. W. M. Proopiomelanocortin (POMC): The cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 407–412, 2006.

MILNER, R. J. et al. The immune response to disialoganglioside GD3 vaccination in normal dogs: A melanoma surface antigen vaccine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3–4, p. 273–284, 2006.

MINAMI, T.; PATNAIK, A. K. Malignant anterior uveal melanoma with diffuse metastasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, n. 12, p. 1894–6, 15 dez. 1992.

MOCHIZUKI, H. et al. BRAF Mutations in Canine Cancers. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129534, 2015.

MODIANO, J. F.; RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J. The Molecular Basis of Canine Melanoma: Pathogenesis and Trends in Diagnosis and Therapy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 163–174, maio 1999.

MOOTSATSOS, I. K. et al. Endogenous lectins from cultured cells: nuclear localization of carbohydrate-binding protein 35 in proliferating 3T3 fibroblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 18, p. 6452–6, set. 1987.

MULLIGAN, R. M. Melanoblastic tumors in the dog. **American journal of veterinary research**, v. 22, p. 345–51, maio 1961.

MURPHY, S. et al. 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.

NAKAHARA, S.; OKA, N.; RAZ, A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 2, p. 267–275, 2005.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 899–909, mar. 2000.

NEWLACZYL, A. U.; YU, L. G. Galectin-3 - A jack-of-all-trades in cancer. **Cancer Letters**, v. 313, n. 2, p. 123–128, 2011.

NIIDA, S. et al. Expression of Mac-2 antigen in the preosteoclast and osteoclast identified in the op/op mouse injected with macrophage colony-stimulating factor. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 6, p. 873–81, jun. 1994.

OCHIENG, J. et al. Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin. **Journal of cellular biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 505–14, 1 dez. 1999.

OCHIENG, J.; FURTAK, V.; LUKYANOV, P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconjugate journal**, v. 19, n. 7–9, p. 527–35, jan. 2004.

OLIVEIRA, J. T. D. E. et al. Differential Expression of Galectin-1 and Galectin-3 in Canine Non-malignant and Malignant Mammary Tissues and in Progression to

Metastases in Mammary Tumors. v. 2222, p. 2211–2221, 2014.

ORCHARD, G. Evaluation of melanocytic neoplasms: application of a pan-melanoma antibody cocktail. **British journal of biomedical science**, v. 59, n. 4, p. 196–202, 2002.

ORCHARD, G. E. Comparison of Immunohistochemical Labelling of Melanocyte differentiation Antibodies Melan-A, Tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 Protein in the Evaluation of Benign Naevi and Malignant Melanoma. **The Histochemical Journal**, v. 32, n. 8, p. 475–481, 2000.

ORDÓÑEZ, N. G. Value of melanocytic-associated immunohistochemical markers in the diagnosis of malignant melanoma: A review and update. **Human Pathology**, v. 45, n. 2, p. 191–205, 2014.

OTTNOD, J. M. et al. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 3, p. 219–229, 2013.

OXENHANDLER, R. W. et al. Malignant melanoma in the Sinclair miniature swine: an autopsy study of 60 cases. **The American journal of pathology**, v. 96, n. 3, p. 707–20, set. 1979.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 4, p. 380–391, 2009.

PANG, L. Y.; ARGYLE, D. J. Veterinary oncology: Biology, big data and precision medicine. **The Veterinary Journal**, v. 213, p. 38–45, 2016.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 2, p. 147–56, fev. 2008.

PARK, J. W. et al. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the SMN protein. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 17, p. 3595–602, 1 set. 2001.

PARSONS, P. G. et al. Histopathology of melanocytic lesions in goats and establishment of a melanoma cell line: a potential model for human melanoma. **Pigment Cell Res**, v. 3, n. 6, p. 297–305, 1990.

PATHAK, S. et al. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. **International journal of oncology**, v. 17, n. 6, p. 1219–24, dez. 2000.

PATNAIK, A. K.; MOONEY, S. Feline melanoma: a comparative study of ocular, oral, and dermal neoplasms. **Veterinary pathology**, v. 25, n. 2, p. 105–12, mar. 1988.

PATTERSON, D. F. **Companion Animal Medicine in the Age of Medical Genetics** *Journal_of_Veterinary_Internal_Medicine*, , 2000.

PAVLETICH, N. P. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 287, n. 5, p. 821–828, 16 abr. 1999.

PAVLIDIS, N. et al. Overexpression of C-myc, ras and C-erb B-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. **Anticancer Research**, v. 15, n. 6 B, p. 2563–2567, 1995.

PESHEVA, P. et al. Galectin-3 promotes neural cell adhesion and neurite growth. **Journal of neuroscience research**, v. 54, n. 5, p. 639–54, 1 dez. 1998.

PLAZA, J. A.; SUSTER, D.; PEREZ-MONTIEL, D. Expression of immunohistochemical markers in primary and metastatic malignant melanoma: a comparative study in 70 patients using a tissue microarray technique. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM**, v. 15, n. 4, p. 421–5, dez. 2007.

POORMAN, K. et al. Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. **Chromosome Research**, v. 23, n. 2, p. 171–186, 2015.

PRIETO, V. G. et al. Galectin-3 expression is associated with tumor progression and pattern of sun exposure in melanoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 22, p. 6709–15, 15 nov. 2006.

PRIETO, V. G.; SHEA, C. R. Immunohistochemistry of melanocytic proliferations. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 7, p. 853–9, jul. 2011.

PROULX, R.; RUSLANDER, M.; HAUCK, L. Treated With External Beam Radiation. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 44, p. 352–359, 2003.

PRZEŹDZIECKI, R.; CZOPOWICZ, M.; SAPIERZYŃSKI, R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 44, n. 4, p. 597–604, dez. 2015.

PUGLISI, F. et al. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. **Cancer Letters**, v. 212, n. 2, p. 233–239, 2004.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597–608, 2000.

RAMOS DA SILVA, S. et al. Human bcl-2 expression, cleaved caspase-3, and KSHV LANA-1 in Kaposi sarcoma lesions. **American journal of clinical pathology**, v. 128, n. 5, p. 794–802, 1 nov. 2007.

RASKIN, R. E.; MEYER, D. J. **Canine and Feline Cytology A color atlas and Interpretation Guide**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2001.

RASSNICK, K. M. et al. Use of carboplatin for treatment of dogs with malignant melanoma: 27 cases (1989-2000). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 9, p. 1444–1448, 1 maio 2001.

REINKE, S. et al. Differential expression of MART-1, tyrosinase, and SM5-1 in primary and metastatic melanoma. **The American Journal of dermatopathology**, v. 27, n. 5, p. 401–6, out. 2005.

RIBEIRO, C. et al. Serum Galectin-3 Levels in Dogs with Metastatic and Non-metastatic Mammary Tumors. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 30, n. 1, p. 13–6, jan. 2016.

RITT, M. G.; WOJCIESZYN, J.; MODIANO, J. F. Functional Loss of p21/Waf-1 in a Case of Benign Canine Multicentric Melanoma. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 2, p. 94–101, 26 mar. 1998.

ROCHAIX, P. et al. PNL2, a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant melanocyte antigen. **Modern pathology : an official journal of the**

United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, v. 16, n. 5, p. 481–90, maio 2003.

RODRÍGUEZ, F. et al. Metastatic melanoma causing spinal cord compression in a horse. **The Veterinary record**, v. 142, n. 10, p. 248–9, 7 mar. 1998.

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

ROGERS, R. S.; GIBSON, L. E. Mucosal, genital, and unusual clinical variants of melanoma. **Mayo Clinic proceedings**, v. 72, n. 4, p. 362–6, abr. 1997.

ROLIM, V. M. et al. Melanoma amelanótico em cães: Estudo retrospectivo de 35 casos (2004-2010) e caracterização imuno-histoquímica. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 340–346, 2012.

RUDZKI, Z.; JOTHY, S. CD44 and the adhesion of neoplastic cells. **Molecular pathology : MP**, v. 50, n. 2, p. 57–71, abr. 1997.

SAMPAIO-GÓES, F. C. G. et al. Expression of PCNA, p53, Bax, and Bcl-X in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: Relationships with prognosis. **Head and Neck**, v. 27, n. 11, p. 982–989, 2005.

SÁNCHEZ, J. et al. Immunohistochemical characterization and evaluation of prognostic factors in canine oral melanomas with osteocartilaginous differentiation. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 5, p. 676–82, 26 set. 2007.

SARAVANAN, C. et al. Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on alpha3beta1 integrin. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 20, p. 3684–3693, 2009.

SASAKI, S.; BAO, Q.; HUGHES, R. C. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. **The Journal of pathology**, v. 187, n. 4, p. 481–9, mar. 1999.

SATO, S.; HUGHES, R. C. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. **The Journal of biological chemistry**, v. 267,

n. 10, p. 6983–90, 5 abr. 1992.

SCHULTHEISS, P. C. Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 18, n. 4, p. 422–5, 25 jul. 2006.

SEETHARAMAN, J. et al. X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13047–13052, 1998.

SEITER, S. et al. Expression of CD44 variant isoforms in malignant melanoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 2, n. 3, p. 447–56, 1 mar. 1996.

SHAH, I. A.; GANI, O. S.; WHEELER, L. Comparative immunoreactivity of CD-68 and HMB-45 in malignant melanoma, neural tumors and nevi. **Pathology, research and practice**, v. 193, n. 7, p. 497–502, 1997.

SHANKARAN, V. et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1107–1111, 2001.

SHEKHAR, M. P. V et al. Alterations in galectin-3 expression and distribution correlate with breast cancer progression: functional analysis of galectin-3 in breast epithelial-endothelial interactions. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 6, p. 1931–41, dez. 2004.

SHELLY, S. et al. Exon 15 BRAF mutations are uncommon in canine oral malignant melanomas. **Mammalian Genome**, v. 16, n. 3, p. 211–217, mar. 2005.

SHELLY, S. M. Cutaneous lesions. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, n. 1, p. 1–46, jan. 2003.

SHIBATA, T. et al. Impact of nuclear galectin-3 expression on histological differentiation and vascular invasion in patients with esophageal squamous cell carcinoma. v. 13, n. 2, p. 235–239, 2005.

SHIMURA, T. et al. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer research**, v. 64, n. 18, p. 6363–6367, 2004.

SIMPSON, R. M. et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 27, n. 1, p. 37–47, jan. 2014.

SLOMINSKI, A.; MOELLMANN, G.; KUKLINSKA, E. L-Tyrosine, L-DOPA, and Tyrosinase as Positive Regulators of the Subcellular Apparatus of Melanogenesis in Bomirski Ab Amelanotic Melanoma Cells. **Pigment Cell Research**, v. 2, n. 2, p. 109–116, 1989.

SMEDLEY, R. C. et al. 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, 2011a.

SMEDLEY, R. C. et al. Immunohistochemical Diagnosis of Canine Oral Amelanotic Melanocytic Neoplasms. p. 25–27, 2011b.

SMITH, S.; GOLDSCHMIDT, M.; MCMANUS, P. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. **Vet Pathol**, v. 39, p. 651–678, 2002.

SOINI, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 OR FLT1. **Histopathology**, v. 39, n. 2, p. 179–186, 2001.

SONG, L. et al. Galectin-3 in cancer. **Clinica Chimica Acta**, v. 431, p. 185–191, 2014.

SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. **Veterinary pathology**, v. 43, n. 2, p. 136–149, 2006.

SPUGNINI, E. P. et al. Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma. **Melanoma research**, v. 16, n. 1, p. 23–7, 2006.

SUNDRAM, U. et al. Expression of the B-cell proliferation marker MUM1 by melanocytic lesions and comparison with S100, gp100 (HMB45), and MelanA. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 16, n. 8, p. 802–10, ago. 2003.

SUZUKI, I. et al. Agouti Signaling Protein Inhibits Melanogenesis and the Response of Human Melanocytes to α -Melanotropin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 108, n. 6, p. 838–842, 1997.

TAMBURINI, B. A. et al. Gene Expression Profiles of Sporadic Canine Hemangiosarcoma Are Uniquely Associated with Breed. v. 4, n. 5, 2009.

TARRANT, J. et al. Diagnosis of malignant melanoma in a horse from cytology of body cavity fluid and blood. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 5, p. 531–535, 5 jan. 2010.

TAYLOR, L. A. et al. p15 Expression Differentiates Nevus from Melanoma. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 12, p. 3094–3099, 1 dez. 2016.

TAZELAAR, H. D.; BATTS, K. P.; SRIGLEY, J. R. Primary Extrapulmonary Sugar Tumor (PEST): A Report of Four Cases. **Modern Pathology**, v. 14, n. 6, p. 615–622, jun. 2001.

TEIXEIRA, T. F. et al. Cell proliferation and expression of connexins differ in melanotic and amelanotic canine oral melanomas. **Veterinary research communications**, v. 38, n. 1, p. 29–38, mar. 2014.

THAMM, D. H. et al. Preclinical investigation of PEGylated tumor necrosis factor α in dogs with spontaneous tumors: Phase I evaluation. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 5, p. 1498–1508, 2010.

THEOS, A. C. et al. The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. **Pigment cell research**, v. 18, n. 5, p. 322–36, out. 2005.

THIJSSSEN, V. L.; HULSMANS, S.; GRIFFIOEN, A. W. The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 2, p. 545–53, fev. 2008.

THODY, A. J. et al. Pheomelanin as well as Eumelanin Is Present in Human Epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, n. 2, p. 340–344, 1 ago. 1991.

TODOROFF, R. J.; BRODEY, R. S. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a

retrospective survey of 361 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 6, p. 567–71, 15 set. 1979.

TROSKO, J. E. Commentary: Is the concept of ?tumor promotion? a useful paradigm? **Molecular Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 131–137, 1 mar. 2001.

TRUONG, M. J. et al. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. **European journal of immunology**, v. 23, n. 12, p. 3230–5, dez. 1993.

TUOHY, J. L. et al. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs: 70 cases (1998–2011). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 11, p. 1266–1273, dez. 2014.

VAIL, D. M. Levels of evidence in canine oncology trials-a case in point. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 11, n. 3, p. 167–168, 2013.

VAIL, D. M.; MACEWEN, E. G. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. **Cancer investigation**, v. 18, n. 8, p. 781–792, 2000.

VALENTINE, B. A. Equine Melanocytic Tumors: A Retrospective Study of 53 Horses (1988 to 1991). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 291–297, set. 1995.

VALENTINE; MCMANUS; KNOX. Malignant transformation of a giant congenital pigmented nevus (hamartoma) in a dog. **Veterinary Dermatology**, v. 10, n. 2, p. 127–130, 1 jun. 1999.

VAN DEN BERG, T. K. et al. LacdiNAc-glycans constitute a parasite pattern for galectin-3-mediated immune recognition. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 3, p. 1902–7, 1 ago. 2004.

VAN DEN BRÛLE, F. A. et al. Galectin-3, a laminin binding protein, fails to modulate adhesion of human melanoma cells to laminin. **Neoplasma**, v. 42, n. 5, p. 215–9, jan. 1995.

VAN DER WEYDEN, L. et al. Cross-species models of human melanoma. **The Journal of Pathology**, v. 238, n. 2, p. 152–165, jan. 2016.

VAN STEEG, H.; KRAEMER, K. H. Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer. **Molecular medicine today**, v. 5, n. 2, p. 86–94, fev. 1999.

VANG, R.; KEMPSON, R. L. Perivascular epithelioid cell tumor ('PEComa') of the uterus: a subset of HMB-45-positive epithelioid mesenchymal neoplasms with an uncertain relationship to pure smooth muscle tumors. **The American journal of surgical pathology**, v. 26, n. 1, p. 1–13, jan. 2002.

VASILJ, A.; KATOVIĆ, S. K. FINE-NEEDLE ASPIRATION CYTOLOGY OF HEAD AND NECK LYMPH NODES IN A TEN-YEAR PERIOD - SINGLE CENTER EXPERIENCE. **Acta clinica Croatica**, v. 54, n. 3, p. 315–8, set. 2015.

VERECKEN, P. et al. Expression of galectin-3 in primary and metastatic melanoma: immunohistochemical studies on human lesions and nude mice xenograft tumors. **Archives of dermatological research**, v. 296, n. 8, p. 353–8, 11 fev. 2005.

VERSTRAETE, F. J. M. Mandibulectomy and maxillectomy. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 35, n. 4, p. 1009–39, viii, jul. 2005.

VESELY, M. D. et al. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 235–271, 2011.

VIDEIRA, I. F. DOS S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76–83, 2013.

VON EULER, H. et al. Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, v. 31, n. 4, p. 377–84, 2008.

WALLACE, J.; MATTHIESEN, D. T.; PATNAIK, A. K. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. **Veterinary surgery : VS**, v. 21, n. 5, p. 337–41, jan. 1992.

WANG, Y. et al. Regulation of prostate cancer progression by galectin-3. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 4, p. 1515–23, 2009.

WEBSTER, J. D. et al. Recommended guidelines for the conduct and evaluation

of prognostic studies in veterinary oncology. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 7–18, jan. 2011.

WEISS, J. et al. Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. **Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer**, v. 139, p. 137–54, 1995.

WESLEY, U. V. et al. Galectin-3 enhances angiogenic and migratory potential of microglial cells via modulation of integrin linked kinase signaling. **Brain Research**, v. 1496, n. 5, p. 1–9, fev. 2013.

WESTBERG, S. et al. Treatment efficacy and immune stimulation by AdCD40L gene therapy of spontaneous canine malignant melanoma. **Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)**, v. 36, n. 6, p. 350–8, 2013.

WIGGANS, K. T. et al. Histologic and immunohistochemical predictors of clinical behavior for feline diffuse iris melanoma. **Veterinary Ophthalmology**, v. 19, p. 44–55, jul. 2016.

WILKERSON, M. J. et al. Metastatic balloon cell melanoma in a dog. **Veterinary clinical pathology**, v. 32, n. 1, p. 31–6, 2003.

WINNEPENNINCKX, V. et al. New phenotypical and ultrastructural findings in spindle cell (desmoplastic/neurotropic) melanoma. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM**, v. 11, n. 4, p. 319–25, dez. 2003.

WINSLOW, C. M. et al. Congenital amelanotic melanoma in a crossbred heifer calf. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 4, p. 544–547, 19 jul. 2017.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. [s.l.] Elsevier/Saunders, 2013.

WOLCHOK, J. D. et al. Safety and immunogenicity of tyrosinase DNA vaccines in patients with melanoma. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 15, n. 11, p. 2044–50, 2007.

XIE, L. et al. The expressions and clinical significances of tissue and serum galectin-3 in pancreatic carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical**

Oncology, v. 138, n. 6, p. 1035–1043, 2012.

YAMAMOTO, T. Molecular basis of cancer: oncogenes and tumor suppressor genes. **Microbiology and immunology**, v. 37, n. 1, p. 11–22, 1993.

YAMAOKA, A. et al. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 154, n. 7, p. 3479–87, 1 abr. 1995.

YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6737–42, 25 jun. 1996.

YANG, Z. et al. [Expression of galectin-3 mRNA in gastric cancer with peritoneal metastasis]. **Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition**, v. 37, n. 1, p. 105–8, jan. 2006.

YOSHII, T. et al. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 9, p. 6852–7, 1 mar. 2002.

YU, F. et al. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15819–15827, 2002.

ZHENG, D. et al. Downregulation of galectin-3 causes a decrease in uPAR levels and inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 32, n. 1, p. 411–418, 2014.

ZHOU, X. et al. Expression and clinical significance of galectin-3 in osteosarcoma. **Gene**, v. 546, n. 2, p. 403–407, 2014.

ZUBOVITS, J. et al. HMB-45, S-100, NK1/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. **Human pathology**, v. 35, n. 2, p. 217–23, fev. 2004.