

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE MELANOMA ORAL EM
CAMUNDONGOS, FRENTE A SUA OCORRÊNCIA ESPONTÂNEA EM CÃES

PONTA GROSSA

2016

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO MELANOMA ORAL EM
CAMUNDONGOS, FRENTE SUA OCORRENCIA ESPONTANEA EM CÃES

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta
Grossa em associação com a Universidade
Estadual do Centro-Oeste, como parte dos
requisitos para obtenção do título de mestre em
Ciências Biológicas (Área de Concentração em
Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Fávero

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

K66 Kmetiuk, Louise Nicolle Bach
 Desenvolvimento e avaliação comparativa
do melanoma oral em camundongos, frente
sua ocorrência espontânea em cães/ Louise
Nicolle Bach Kmetiuk. Ponta Grossa, 2016.
59f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Orientador: Prof. Dr.
Giovani Marino Fávero.

 1.Melanoma oral. 2.Melanoma canino.
3.Melanoma murino. I.Fávero, Giovani
Marino. II. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Mestrado em Ciências
Biológicas. III. T.

CDD: 576



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva



PARANÁ

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 11/2016

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Louise Nicolle Bach Kmetiuk**.

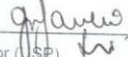
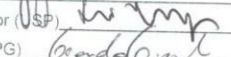
Aos vinte dias do mês de dezembro de dois mil e dezesseis, no auditório do Programa, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Giovani Marino Fávero em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Louise Nicolle Bach Kmetiuk**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Giovani Marino Fávero (Orientador UEPG), Dr. Tharcisio Citrangulo Tortelli Junior (USP) e Dr. Leandro Cavalcant Lipinski (UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **"Desenvolvimento e Avaliação Comparativa do Melanoma Oral Murino, Frente a Ocorrência Espontânea em Cães"**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**, assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**, o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 20 de dezembro de dois mil e dezesseis.

Prof. Dr. Giovani Marino Fávero (UEPG) 
Prof. Dr. Tharcisio Citrangulo Tortelli Junior (USP) 
Prof. Dr. Leandro Cavalcant Lipinski (UEPG) 

À DEUS.

Aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTO

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao professor **Giovani Marino Fávero**, pela orientação, ideias e ensinamentos desde o início. Pelas oportunidades em projetos paralelos e estágio. Pela autonomia, que proporcionou crescimento pessoal e profissional. Pela paciência, confiança e disponibilidade. Pela inspiração como pesquisador e indivíduo.

Aos meus pais **Silvana e Maurício**, meu irmão **João Paulo**, avós e tios pela compreensão, motivação e amor.

Ao professor **Leandro Cavalcanti Lipinski** por todas as oportunidades, ensinamentos, pela confiança, por acreditar em mim e pelo exemplo a ser seguido.

À professora **Kátia Sabrina Paludo**, pelo carinho, apoio, ensinamentos e colaboração em todo o andamento do trabalho.

Ao professor **Marcos Ricardo da Silva Rodrigues**, pelas oportunidades, conhecimento, parceria e confiança.

À professora **Iriane Eger**, pelo carinho, apoio, disponibilidade e ensinamentos.

Ao meu tio **Renato van Wilpe Bach**, que me faltam palavras para explicar a sua grandiosidade como mestre, amigo e padrinho.

Aos membros da banca de defesa, **Leandro Cavalcanti Lipinski** e **Tharcisio Citrangulo Tortelli Junior**, pelo aceite e disponibilidade.

Ao professor **Alexander Welker Biondo**, por elucidar o valor da perseverança no meio acadêmico.

Aos **colegas e amigos**, que me acompanharam e torceram por mim.

À amiga pessoal **Maisa Oda**.

Às **técnicas** do Biotério Central da UEPG.

A todos da **PPG Biologia Evolutiva**, em especial à Zoli.

À **CAPES** pelo auxílio financeiro.

"Porque eu sou do tamanho do que vejo

E não do tamanho da minha altura..."

Alberto Caeiro, "O Guardador de Rebanhos - Poema VII"

Heterônimo de Fernando Pessoa

RESUMO

Introdução: O Melanoma é a principal neoplasia em cavidade oral de cães domésticos. Ocorre principalmente em gengiva, e caracteriza-se pela progressão acelerada, altos índices de recidiva, metástase e resistência a terapias propostas. Tais aspectos impulsionaram o presente estudo, considerando a ausência de um modelo experimental para essa neoplasia, que possibilite a realização de ensaios pré-clínicos. **Objetivos:** Induzir a formação de melanoma oral murino em camundongos C57Bl/6J, e estudar suas características macroscópicas e histopatológicas. **Método:** trata-se de um estudo experimental. Trinta camundongos C57Bl/6J (*Mus musculus*) foram submetidos a indução tumoral através da injeção de células da linhagem de melanoma murino B16F10 em gengiva inferior direita porção vestibular, em duas concentrações celulares, originando dois grupos distintos: Grupo 1 (n=15) que receberam 0,1 ml contendo 1×10^4 células de melanoma murino B16F10; Grupo 2 (n=15) que receberam 0,1 ml contendo 5×10^4 células de melanoma murino B16F10. Para ambos os grupos foram realizadas eutanásias programadas aos sétimo, décimo quarto e vigésimo-primeiro dias de pós-operatório, com ressecção ex-vivo da hemicabeça direita. Após a exclusão dos indivíduos que foram a óbito antes do período determinado para eutanásia, obteve-se um número de indivíduos na amostra (n) de 21. Foi realizada análise macroscópica das formações tumorais. Para o estudo histológico comparativo, analisaram-se amostras de melanoma oral canino melânico no que tange aos aspectos morfométricos e morfológicos. **Resultados:** Houve diferença no desenvolvimento tumoral para cada concentração celular utilizada na indução. Notou-se correlação positiva entre volume tumoral e número de células. **Conclusão:** A indução de melanoma oral em camundongos para fins de modelo de estudo pré-clínico para cães se mostrou uma alternativa útil, viável e reproduzível.

Palavras-chave: Melanoma oral. Melanoma canino. Melanoma murino.

ABSTRACT

Introduction: Melanoma is the most common neoplasm in oral cavity of dogs. Melanoma has a predilection for the gum, and it is characterized by accelerated progression and high rates of relapse, metastasis and resistance to proposed therapies. Those factors inspire the present study, considering the lack of an experimental model for melanoma. **Method:** This is an experimental study. Thirty C57Bl / 6J mice (*Mus musculus*) were submitted to tumor induction by injecting murine melanoma B16F10 cells into the right lower gum using two different cell concentrations. Mice were divided in two groups: Group 1 (n = 15) received 1×10^4 murine melanoma B16F10 cells injection; Group 2 (n = 15) received 5×10^4 murine melanoma B16F10 cells injections. For both groups, euthanasia was scheduled at the 7th., 14th. and 21th. postoperative day, with post-mortem hemi-resection of the jaw. Individuals who died before the euthanasia period were excluded, leaving 21 mice. Macroscopic analysis of tumor formations was performed. For comparative histological study, oral canine melanoma samples were analyzed for morphological aspects. Data set analyzed with BioStat 5.3 and submitted to non-parametric statistical tests. **Results:** Different tumor characteristics (tumor volume, presence of irregular margins, ulceration and dark coloration) were observed for each cell concentration used in the induction, as well perfect correlation between tumor volume and tumor growth. **Conclusion:** The induction of oral melanoma in mice for purposes of preclinical study model for dogs is an useful, viable and reproducible alternative.

Key-words: oral melanoma, canine melanoma, murine melanoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Injeção das células tumorais B16F10 na porção vestibular da gengiva ventral, mediante abertura da rima oral, com o animal sob anestesia. (FONTE: O AUTOR).....	35
Figura 1 : Figura para dados qualitativos ordinais de volume tumor em seus respectivos grupos de experimentação	39
Figura 2 : Exemplos de aspecto tumoral em sete (A), quatorze (B) e vinte e um dias (C) após indução respectivamente, para Grupo 1. (ESCALA: 1cm)	40
Figura 3 : Exemplos de aspecto tumoral em sete (A), quatorze (B) e vinte e um dias (C) após indução respectivamente, para Grupo 2. (ESCALA: 1mm)	40
Figura 1 : Figura para dados qualitativos ordinais de volume tumor em seus respectivos grupos de experimentação	39
Figura 2 : Figura para médias de volume tumoral versus tempo de desenvolvimento	42
Figura 3 : Figura de dispersão para dados qualitativos de tipo de formação versus ulceração.....	44
Figura 4: Figura de dispersão para dados qualitativos de volume tumoral <i>versus</i> coloração.....	45
Figura 5 : Figura de dispersão para dados qualitativos de volume tumoral versus ulceração.....	45
Figura 6 : Figura de dispersão para dados qualitativos de coloração tumoral <i>versus</i> ulceração	46
Figura 7 : Figura de dispersão para dados qualitativos de margens tumorais versus ulceração.....	46
Figura 4 : Cortes histológicos de melanoma oral murino correspondentes ao 14º dia de desenvolvimento tumoral, Grupo 1. (A e B) Presença de grânulos de melanina e vasos sanguíneos. (C e D) Perda de integridade tecidual. Aumento da objetiva: 20x.	47
Figura 5 : Cortes histológicos de melanoma oral murino correspondentes ao 14º dia de desenvolvimento tumoral, Grupo 2. (A, B e C) Grânulos de melanina, vasos sanguíneos, perda de integridade tecidual podem ser observados. Aumento da objetiva de 20x. (D) Vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. Aumento da objetiva de: 40x.....	48
Figura 6 : Cortes histológicos de melanoma oral canino. (A e B) Grânulos de melanina e perda da integridade tecidual. (C e D) Necrose e vasos sanguíneos. Aumento da objetiva de 20x	49
Figura 7 : Cortes histológicos de melanoma oral canino. (A e B) Áreas necróticas, presença de vasos sanguíneos e grânulos de melanina, Aumento da objetiva: 20x. (C e D) Células arredondadas formando feixes. Presença de infiltrado inflamatório. Perda da integridade tecidual. Aumento da objetiva: 100x e 40x.....	50

LISTA DE SIGLAS

CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CTNNB1	gene codificante da beta-catenina
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DNA	Ácido Desorribonucleico
Gy	Gray
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGFR	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR-beta	Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR-alfa	Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas
rs	Coeficiente de Correlação de Spearman
RT-PCR	Reação de Transcrição Reversa em Cadeia de Polimerase

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 : Grupos de experimentação.....	26
TABELA 2 : Grupos e subgrupos de experimentação. Sobreviventes ao final do experimento.....	38
TABELA 3 : Volume tumoral nos grupos e subgrupos do estudo experimental.....	39
TABELA 4 : Comparação de volumes tumorais em momentos diversos, parte 1.....	40
TABELA 5 : Comparação dos volumes tumorais nos diversos momentos, parte 2...	41
TABELA 6 : Comparação dos volumes tumorais em diversos momentos, parte 3. ..	42
TABELA 7 : Correlação entre os volumes tumorais em momentos diferentes.....	43
TABELA 8 : Transformação das variáveis em qualitativas ordinais.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO MELANOMA ORAL CANINO	13
1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DO MELANOMA ORAL CANINO.....	16
1.4 TRATAMENTO DO MELANOMA ORAL CANINO	20
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 LOCAL DO ESTUDO	24
3.2 AMOSTRA ESTUDADA.....	24
3.3 DESENHO DE ESTUDO.....	24
3.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	24
3.5 AMOSTRAS DE MELANOMA ORAL CANINO	24
3.6 EXPERIMENTO	25
3.6.1 Cultivo das células tumorais	25
3.6.2 Implante de células tumorais	25
3.6.3 Técnica de Ressecção Hemicabeça Direita em <i>Mus musculus</i>	26
3.6.4 Caracterização macroscópica do modelo de Melanoma Oral Murino	26
3.6.5 Exame Histopatológico	26
3.6.5.1 Melanoma oral murino	26
3.6.5.2 Melanoma oral canino.....	27
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 CAPÍTULO I	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8 ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A evolução propiciou aos mamíferos a multicelularidade e variabilidade de células e tecidos. A cooperação entre as células desses organismos viabiliza o desenvolvimento, manutenção e reprodução. Alterações nos mecanismos de morte celular, inibição da proliferação, designação dos recursos e funções, bem como da conservação do ambiente extracelular caracterizam quebra da homeostasia multicelular pela desregulação nos processos de diferenciação celular, denominada câncer (AKTIPIS et al. 2015).

Neste cenário de desenvolvimento celular anormal, os tecidos são ecossistemas, participando do processo adaptativo há mais de 1 bilhão de anos de evolução. A malignidade dos tumores está relacionada às características fenotípicas que afetam a sua capacidade proliferativa, de expansão, angiogênese, migração e invasão, possibilitadas por mutações e mecanismos epigenéticos inerentes. Dessa maneira, os cânceres se enquadram no darwinismo, e suas variantes estão sujeitas a seleção natural (GREAVES; MALEY, 2012). A heterogeneidade de recursos (nutrientes e oxigênio) no microambiente de uma neoplasia atua como agente de seleção natural, visto que células que coincidentemente possuem maior capacidade de evasão, migram para novos sítios, dando origem a metástases, clinicamente relevantes pois influencia a variação da sobrevida do paciente (CHEN et al., 2011).

O câncer tem despertado o interesse da comunidade veterinária clínica e científica, em decorrência do aumento da casuística (SOUZA, 2006). Em estudo, aproximadamente 45% dos animais portadores de neoplasia entraram em óbito por evolução da doença e comprometimento do estado geral de saúde (WITHROW; MACEWEN, 2013).

Neoplasias orais estão entre as mais comuns na rotina clínica de pequenos animais, ocupado o quarto lugar para cães e gatos (FOSSUM et al., 2008), notadamente em cães (RAMOS-VARA et al. 2000), com o melanoma apresentando alta incidência (BERGMAN, 2007).

Modelos de estudo comparando o desenvolvimento de neoplasias em cães e humanos (MACEWEN, 1990), ou comparando melanoma oral canino e humano (SPANGLER; KASS, 2006), tem limitações devido a diferenças anatômicas e biológicas que geram variações de prevalência entre essas espécies.

A possibilidade de indução de melanoma em cavidade oral de camundongos através da linhagem de células de melanoma murino B16, e o desenvolvimento de um modelo murino para essa neoplasia impulsionaram o presente estudo. A alta casuística, progressão acelerada, bem como a ausência de medidas terapêuticas consideráveis para controle do Melanoma Oral Canino vislumbram a necessidade de modelo para realização de ensaios pré-clínicos.

1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO MELANOMA ORAL CANINO

Lesões em cavidade oral são relativamente frequentes em cães, sendo a quinta neoplasia mais usual neste tipo de animal. Há as odontogênicas (epúlide, quisto, ameloblastoma e odontoma) e as não-odontogênicas, que surgem em outras estruturas orais que não dentárias, e são em maioria malignas, como carcinoma espinocelular, fibrossarcoma e melanoma (REQUICHA et al., 2015).

Melanoma é um tumor em melanoblastos e melanócitos que são derivados da neuroectoderme (SILVA et al., 2006).

Foi primeiramente relatado por Bunker, em 1882 (CAMARGO et al., 2008). Apresenta elevada casuística e progressão altamente agressiva (POORMAN et al., 2015). Relata-se pré-disposição racial baseada a pigmentação da mucosa oral, para Cocker Spaniel e Pastor alemão (FOSSUM et al., 2008).

O local de predileção é a gengiva, com 55% dos casos, mas também se desenvolve em palato, porção dorsal língua, mucosa oral e labial, faringe e amígdalas (GIOSO, 2005), e se caracterizam por invasão precoce local (FOSSUM, 2008).

Inicialmente, pode se mostrar benigno e delimitado na mucosa oral, com expressiva quantidade de melanina. Quando este demonstra malignidade, a formação geralmente não é encapsulada, ocorrendo infiltração regional (tecidos duros) e possível esfoliação dentária (SMITH, 2005).

O formato celular e a quantidade de citoplasma predizem características de comportamento de melanomas melânicos e amelanóticos. A produção pode reduzir significativamente com avanço tumoral, e as células se tornarem mais fusiformes (encurtadas ou alongadas) com maior e mais claro citoplasma. Constatou-se que, células amelanóticas fusiformes em alta proliferação reduziram sua capacidade de produzir melanina, ao passo que apresentaram fibroblastos que os possibilitaram maior síntese de mucopolissacarídeos e cartilagem (OYAMADA et al., 2007).

As diferenças entre melanoma humano e melanoma canino (orais e cutâneos) são discretas e iniciadas por vias moleculares distintas (POORMAN et al., 2015). Diferente do melanoma humano, em que a maioria decorre de mutação gênica em conjunto com exposição recorrente a radiação ultravioleta, o melanoma oral canino não possui sua formação bem elucidada, mas pode-se dizer que ocorre quebra do controle dos queratinócitos para com os melanócitos (SMITH et al., 2002). Para cada melanócito existem, em média, cinco queratinócitos que formam junções para aderência e regulação, por meio da desmoglina, conexinas e E-caderina, em epidermes saudáveis. Proliferam-se somente em casos de injúria ou regeneração, regulada pelos queratinócitos (HAASS et al., 2005). Não havendo mais controle, multiplicam-se de forma arbitrária, comportando-se de maneira benigna (denominado melanocitoma) ou maligna (melanoma).

Análises *in vitro* de células de melanoma, notou-se que a superfamília Snail de fatores de transcrição atua na regulação negativa da expressão de E-caderina em células de melanoma, contribuindo para oncogênese e invasão tumoral dessa neoplasia (POSER et al., 2001),

Os níveis de expressão de CTNNB1 (gene codificante da beta-catenina) e do complexo E-caderina em amostras de melanoma cutâneo e oral canino foram verificados através de RT-PCR semiquantitativo e Imunohistoquímica. Detectaram um aumento considerável na expressão do gene CTNNB1, sendo este superior nos tumores de pele. Preconizou-se que talvez a maior síntese da proteína beta-catenina esteja relacionada a tumorigênese, porém não ao grau de malignidade. Observou-se perda crítica de E-caderina nos melanomas analisados de ambas as localizações (HAN et al., 2012)

Com o objetivo de comparar as homologias e diferenças entre melanoma oral e cutâneo canino e humano, foram pesquisadas mutações somáticas em 6 genes (BRAF, ARN, PTEN, KIT, GNAQ, CDK4), que comumente sofrem mutação nessa neoplasia em humanos, a partir de 35 amostras de cães afetados e de 28 controles. Dois genes se mostraram portadores de variantes somáticas com efeito prejudicial, sendo eles: ARN na posição Q61 e PTEN na posição G251. A primeira mutação citada se caracteriza como a mais frequente em melanomas humanos. A semelhança genética aclara a possibilidade de ensaios clínicos relevantes para ambas as espécies (GILLARD et al., 2013),

O comportamento biológico dos melanomas caninos pode ser analisado por informações como localização, dimensões, parâmetros histológicos e estadiamento. Devido a insuficiência em delinear o comportamento desta neoplasia, há busca constante por outros fatores (BERGMAN, 2012). Os melanomas caninos em cavidade oral são em 90% dos casos malignos, mal responsivos ao tratamento antineoplásico (BERGMAN, 2007). Diferem dos cutâneos, que compreendem a terceira neoplasia mais frequente em pele de cães (VILLAMIL et al., 2011), com apenas de 5 a 11% de comportamento maligno (SMITH et al., 2002).

Em estudo retrospectivo, relatou-se que houve variação comportamental e a gravidade em dependência localização anatômica, sendo que 97% dos melanomas orais analisados apresentavam-se malignos, com 25% de casos de metástase no momento do diagnóstico, sobretudo em linfonodos e pulmão. A idade média de ocorrência foi de 11 anos. Animais com melanocitoma apresentaram tempo médio de sobrevivência de 1.463 dias, em contraste daqueles com melanoma oral, com 200 dias (GILLARD et al., 2013)

Em 35 casos de cães com melanoma, aqueles diagnosticados amelanicos concentraram-se em cavidade oral (57,1% dos casos). Os animais sem raça definida (SRD) eram maioria, seguido da raça Poodle, Dachshund e Cocker. A idade média de acometimento foi de 10,7 anos, e equilibrada entre os gêneros. Ao exame histológico, melanomas orais apresentaram-se em maior escala no padrão misto (ROLIM et al., 2016). Relata-se maior prevalência em machos (FOSSUM et al., 2008).

A expressão de PDGFR foi avaliada em casos de melanoma oral canino, com objetivo de relacioná-la a patogênese e prognóstico. Para tanto, utilizaram amostras provenientes de 48 animais, com idade de manifestação variou de 5 a 14 anos, em maioria machos (64.6%) e da raça Dachshunds (10.4%). Este estudo sugere relação entre a expressão de PDGFRs e patogênese deste tipo tumoral, e que a coexpressão de PDGFRs-alfa e beta pode ser usada como marcador de prognóstico negativo para a neoplasia (IUSSIC et al., 2016).

Registros de 338 casos de melanoma oral foram avaliados, ocorridos em raça Cocker Spaniel e outras raças de mucosa pigmentada. Possuíam idade média de 11,4 anos. Gengiva destacou-se como o local de predileção com 35,2% dos casos. Histologicamente, caracterizaram-se como tumores de células mista com comum presença de invasão óssea. A sobrevida média oscilou de 5 a 7 meses (RAMOS-VARA et al., 2000).

Sinais clínicos associados a presença de melanoma oral em cães são: apatia, ptialismo, disfagia, anorexia, halitose, sangramento oral, emagrecimento progressivo. Sinais respiratórios podem ser diagnosticados na presença de metástase pulmonar (FOSSUM et al., 2008). Ao exame físico, pode apresentar-se inicialmente como pequena mácula, com aspecto benigno a princípio, ou mais frequentemente é notada massa séssil ou pedunculada, com formato irregular ou arredondado. Quanto a coloração, pode ir de amelanica a rósea, cinzenta, castanha ou negra, distribuindo-se de maneira homogênea ou em padrão graduado de cor. Possível consistência mole e friável a palpação. Esfoliação dentária pode ser observada (REQUICHA et al., 2015). Devido à alta capacidade proliferativa, mostram-se ulcerados e hemorrágicos muitas vezes. Os melânicos sintetizam grande quantidade de melanina, já os amelanicos não a produzem ou sintetizam pequenas quantidades, necessitando diagnóstico diferencial para outros tipos tumorais (BERGMAN, 2012).

1.3 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DO MELANOMA ORAL CANINO

Para determinação do prognóstico e conduta terapêutica, o sistema TNM (OMS- Organização Mundial de Saúde) considera a localização e extensão primária

do tumor (T), o acometimento de linfonodos regionais (N) e metástases em outros órgãos (M) (BERGMAN, 2007).

O estadiamento do melanoma oral se baseia em suas dimensões, sendo o grau I menor que 2 cm, grau II de 2 cm a 4 cm, grau III igual ou superior a 4 cm (podendo apresentar metástase regional) e o grau IV com metástase a distância. Apesar de amplamente difundido, o estadiamento da OMS (Organização Mundial da Saúde) possui lacunas, visto não considerar o porte do paciente ao analisar as dimensões da formação tumoral. No que tange ao tempo médio de sobrevivência (TMS), relatou-se que cães com melanoma oral grau I, conduta terapêutica de ressecção e uso de terapia adjuvante, o TMS é de em média 12-24 meses com óbito decorrente de metástase a distância, em geral sem recorrência local (BERGMAN, 2012). A sobrevida média após tratamento é de 8 meses (FOSSUM, 2008), diminuindo naqueles que desenvolvem metástase (WITHROW & MACEWEN, 2013).

Os principais diagnósticos diferenciais do Melanoma Oral Canino são: Fibrossarcoma, Hemangioma, Carcinoma Espinocelular, Sarcoma Anaplásico, Epúlido Acanomatosa, Melanocitoma (REQUICHA et al., 2015).

A associação de exame histopatológico e imunohistoquímico é a mais adequada para estabelecimento de diagnóstico e de prognóstico (SMITH et al., 2002).

A partir de 596 amostras de neoplasias em cavidade oral de cães, 38 destas foram também analisadas por Citologia Aspirativa pré-operatória, Imunocitoquímica e Imunohistoquímica, obtendo totalidade de correspondência ao diagnóstico. Considerou-se o diagnóstico através de citologia aspirativa pré-operatória plausível para diferenciação de tumores em cavidade oral (PRZEZDZIECK et al., 2015).

Alguns fatores podem ser analisados a fim de chegar a um prognóstico, porém a ampla variação da sobrevida denota a imprevisibilidade da doença. Analisando atipia nuclear, estágio clínico segundo a OMS, índice mitótico, metástase e dimensões, evidenciou-se ampla correlação relacionada ao tempo posterior a ressecção de vida do paciente. Observaram que nem sempre uma malignidade histológica significa malignidade biológica, visto que apenas 59% dos casos com correspondência (SPANGLER; KASS, 2006).

Foi relacionada menor sobrevida em pacientes que possuíam índices mais elevados da proteína nuclear ki67, constatado por marcador imunohistoquímico. Essa é expressa nas células em divisão, utilizada para análise de crescimento tumoral (BERGIN et al., 2011). De patogênese ainda obscura, sua malignidade pode se dever a perda de proteínas supressoras de tumor (a exemplo a p53) (WITHROW & MACEWEN, 2013).

Sabe-se que o desenvolvimento inflamatório possibilita crescimento e suprimento de células tumorais malignas, e há também fatores que inibem estas células, conforme a dinâmica do ambiente. Analisando a possível similaridade entre o melanoma oral canino e melanoma cutâneo humano, quantificou-se a presença de dois mediadores inflamatórios, a leptina e de enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (GREENE et al., 2013). A enzima óxido nítrico sintase (iNOS) é um produto do Óxido Nítrico e usada como indicador de seus níveis. Em humanos com melanoma cutâneo e metástase em linfonodos, associou-se elevada concentração a menor sobrevida (EKMEKCIOGLU et al., 2006). A leptina é uma proteína secretada por adipócitos, a qual foi detectada em cultura de células desta neoplasia, e em linfonodos sentinela (ELLERHORST et al., 2010). No que tange a esta, a maior parte dos tumores apresentaram-se positivos. Com relação ao iNOS, apesar do reduzido espaço amostral, os resultados foram contrastantes aos de melanoma cutâneo em humanos, com menor percentual desta enzima naqueles que apresentaram maior índice de mitose. Isso demonstra que os tipos de melanoma relacionados podem ter mecanismos de dependência diferentes em relação a atividade de iNOS. Tal dado corrobora que a tumorigênese do melanoma oral não está relacionada a exposição ultravioleta, sendo suas vias independentes dessa radiação. Evidências sugerem então que o melanoma oral canino seria passível de correlação com o de mucosas humanas (mutações BRAF são raramente encontradas em melanoma oral canino, e as mutações c-KIT aparecem tanto em orais caninos, como mucosos humanos) (GREENE et al., 2013).

Devido à heterogeneidade celular do melanoma, nem todas reagem de forma previsível, sendo importante estudos a respeito do reconhecimento das células-tronco tumorais, bem como das vias por elas utilizadas. Essas vias, como vias embrionárias dormentes, podem ser ativadas no desenvolvimento tumoral, possibilitando também metástases (TAKEBE; IVY, 2010).

No que tange a infiltração do melanoma oral em estruturas ósseas, é necessária a sua diferenciação para com o osteossarcoma, já que as medidas terapêuticas e os prognósticos são distintas. A ocorrência de melanoma osteogênico é considerada rara devido a sua baixa casuística. Dois casos de melanomas osteogênicos foram diagnosticados após exame histopatológico e imunohistoquímico, sendo o primeiro um melanoma gengival maxilar recorrente (após excisão e radioterapia) e sem sinais de metástase em fêmea da raça Shih Tzu, com 11 anos de idade. O segundo caso, em fêmea de Terrier Escocês de nove anos de idade. Possuía massa pedunculada na localização do primeiro pré-molar direito porção posterior, com pequena lise óssea e alterações de conformação mandibular a nível de incisivos inferiores. Os sinais de metástase pulmonar surgiram após excisão e 25 meses de terapia adjuvante, sendo então eutanasiada. Constataram que a formação neoplásica óssea se deveu, muito possivelmente, a metaplasia por melanócitos malignos incorporados ao tecido ósseo (ELLIS et al., 2010). Alguns argumentos suportaram essa hipótese: processos inflamatórios pós ressecção/biópsia do melanoma, com invasão de células malignas no tecido conjuntivo; células tumorais estimulando a diferenciação do estroma mesenquimal em células ósseas; em osteossarcomas geralmente não há metástase em linfonodos (FERGUSON et al., 2001). A delineação do comportamento do Melanoma Osteogênico e sua distinção frente os outros tipos malignos de melanoma é prejudicada pela sua baixa casuística, sendo encarados terapeuticamente como outros tipos de melanoma. Recentemente, descobriu-se que metaloproteinases/colagenases auxiliam na invasão tumoral. O diagnóstico de Melanoma Osteogênico para ambos os casos foi confirmado pela presença de células neoplásicas com grânulos de melanina e de proteína S-100 positivas, e não apresentarem tumor ósseo primário (ELLIS et al., 2010).

Em neoplasias, a multiplicação arbitrária das células desencadeia resposta imunológica, chamada de anti-tumoral. Taxas de células T reguladoras no sangue foram dosadas (amostra anterior a ressecção do tumor) a partir de sete cães diagnosticados com melanoma oral primário, e também de um grupo controle formado por dez cães. Como resultado tiveram que houve prevalência de células T reguladoras em cães com melanoma maligno, e que essas estavam em superior concentração no tumor (TOMINAGA et al., 2010)

A metástase regional ocorre em 70 a 90% dos casos, e a metástase a distância afeta especialmente os pulmões, seguido de outros órgãos como fígado, cérebro e rins (GIOSO, 2005). Em estudo retrospectivo de melanoma oral canino, 80 a 100% dos casos possuíam prognóstico sombrio, com invasão local, metástase regional ou a distância (SPANGLER; KASS, 2006).

Dentre os marcadores mais utilizados para esse tipo tumoral, tem-se a proteína S-100, a qual manifesta-se em melanomas humanos, além de células da glia e de Schwann. Melan-A possui alta sensibilidade e especificidade para formações melânicas. O marcador vimentina é utilizado para diferir tumores de origem epitelial dos de mesenquimal (SMITH et al., 2002).

1.4 TRATAMENTO DO MELANOMA ORAL CANINO

O tratamento de eleição é imediato para melanoma grau I é a ressecção completa. Mediante as extensões da lesão em gengiva, considera-se mandilectomia ou maxilectomia parciais (BERGMAN, 2012). A excisão cirúrgica do tumor deve ser extensa e respeitar as margens definidas. As técnicas variam de mandibulectomia, maxilectomia, glossectomia e tonsilectomia (FOSSUM et al., 2008).

Realização de radioterapia pode ser considerada nos casos de impossibilidade de ressecção, ressecção incompleta de margens, metástase regional, porém esta alternativa não é totalmente eficaz e nem impede recidiva. A exemplo do melanoma humano, o canino também parece ser extremamente resistente a quimioterápicos. Alguns antineoplásicos já testados (como carboplatina, cisplatina, piroxicam, dacarbazina, melfalano, doxorubicina), em grupos específicos ou individualmente, mostraram pouca resposta ou não durável (BERGMAN, 2012).

A capacidade de angiogênese está relacionada ao desenvolvimento e agressividade de tumores sólidos (PEREIRA et al., 2008), como o melanoma. A utilização de quimioterapia a baixa dose possibilita a inibição da neovascularização pela citotoxicidade endotelial e também normaliza os vasos tumorais pela trombospondina-1. Esse estudo utilizou de baixas doses de Ciclofosfamida associada ou não ao Piroxicam, a fim de determinar eficácia mediante controle da neovascularização e normalização do aspecto vascular, em modelo de xenotransplante de melanoma oral canino em dorso de camundongos

(CHOISUNIRACHON et al., 2013). Isolada, a Ciclofosfamida causa desequilíbrio de proteínas angiogênicas, acarretando em elevação número de vasos (PATTEN et al., 2010). Obtiveram como resultado que a associação de inibidor de pró-angiogênese tem capacidade de inibir a neovascularização do tumor, com relação ao número e sanidade destes vasos, em melanoma.

A eficácia de três protocolos de intensidade de Gy e diferentes fracionamentos em 140 casos de melanoma oral canino foi testada, associando com fatores prognósticos e com quimioterapia sistêmica. Constatou-se que não houve diferença de sobrevida nos diferentes protocolos, bem como aqueles animais que receberam quimioterapia associada, não apresentaram melhora no curso metastático da doença. Apontou-se a imunoterapia como alternativa terapêutica (PROUX et al., 2003)

Como exemplos de vacinas, tem-se as de células de tumores alogênicos transfectados com interleucina 2; células dendríticas inclusas de antígenos de diferenciação melanossomal; células tumorais autólogas; imunoestimulante não-específico encapsulado com lipomas. Atentou-se que uma maneira de induzir a resposta imune é vacinando com antígeno xenogênico, ou como exemplo, DNA homólogo ao antígeno da neoplasia. Neste caso, mostrou-se que a vacinação com DNA não foi eficaz quando utilizado auto-DNA, diferente da resposta a indução com DNA oriundo de outra espécie (BERGMAN, 2012) com melanoma oral canino. A vacinação com DNA xenogênico de humanos, com genes codificantes da família da tirosinase (glicoproteína melanosomal necessária na síntese de melanina) induziu resposta imune através de anticorpos e células T citotóxicas, sendo considerada segura e potencialmente terapêutica em estudos de fase I em cães com melanoma oral (BERGMAN et al., 2006).

Em contrapartida, após análise da vacinação com Oncept® em 45 cães com melanoma oral, relatou-se não haver melhora na sobrevida, o que incluiu tempo livre da doença e sobrevida livre de progressão tumoral. Relacionaram isso a variação da presença de tirosinase nas manifestações de melanoma oral, que influenciaria a resposta imune. Essa variação está ligada aos diferentes níveis de pigmentação entre os melanomas. A divergência de resultados apontou para necessidade de um estudo retrospectivo randomizado para conclusões mais palpáveis a respeito do uso da vacina Oncept® (OTTNOD et al., 2013)

A necessidade de estudo prospectivo para avaliar a influência na sobrevida foi relatada a partir da análise de cães vacinados com Oncept®. Nesse estudo, 32 cães afetados pelo Melanoma Oral Canino, submetidos a ressecção neoplásica e vacina Oncept®, sendo a radioterapia instituída em casos de impossibilidade de ressecção de margens completas, foram avaliados quanto a sobrevida. A vacinação foi instituída quando a doença estava controlada localmente. A sobrevida média foi de 335 dias, não havendo diferença significativa entre os grupos vacinado e não- vacinado. O momento de submissão ao tratamento variou, e apesar de isentos de metástase, pode ter influenciado na eficácia da vacina. (TREGGIARI; GRANT; NORTH, 2016),

Há grande interesse em torno de medidas terapêuticas que atuem sobre vias de desenvolvimento essenciais para o melanoma oral canino. A expressão de β -catenina foi detectada por Western blotting em células de melanoma oral canino e, diferentemente do relatado para o cutâneo, não houve identificação de β -catenina. Haja vista a participação da COX-2 no desenvolvimento e progressão tumoral em melanomas humanos, Seo et al. (2014) testaram a eficácia do Celecoxib (CELEBREX®, Onseral®, Pfizer, New York, USA) sobre a expressão dessa enzima em duas linhagens de melanoma oral canino (LMeC e CMeC-1). Observou-se efeito inibitório da proliferação celular em ambas as linhagens, sendo que: ocorreu apoptose na linhagem que expressava altamente COX-2 e foi submetida a elevada concentração do agente, e interrupção do ciclo celular naquela com menor expressão de COX-2 (CHON et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O Melanoma Oral Canino apresenta alta incidência, com metástases frequentes e progressão acelerada. A ausência de um modelo experimental para essa neoplasia, que possibilite a realização de ensaios pré-clínicos impulsionou o presente estudo.

Objetivo Geral:

Induzir a formação de melanoma oral murino em camundongos C57Bl/6J e estudar suas características macroscópicas e histopatológicas, comparando com os melanomas espontâneos de cães.

Objetivos Específicos:

1. Avaliação da proporção celular e do tempo de implante para o aparecimento do tumor em camundongos.
2. Avaliação periódica do tumor implantado.
3. Realizar a comparação histológica entre melanoma oral de cães com o melanoma oral murino desenvolvido.
4. Análise crítica para validação do modelo de melanoma oral murino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

A experimentação animal foi realizada no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As amostras foram processadas e analisadas no laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.2 AMOSTRA ESTUDADA

Foram utilizados 30 camundongos (*Mus musculus*, *Rodentia Muridae*), da linhagem C57Bl/6J, submetidos a implante de células tumorais da linhagem B16F10 (melanoma murino), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde está registrado sob os seguintes protocolos: 8398/2015 e 674/2016.

Analizou-se amostras histopatológicas (em blocos de parafina) de 19 casos de Melanoma Oral Canino, provenientes da FCAV/UNESP- Jaboticabal (São Paulo-Brasil), e obtidos mediante parceria.

3.3 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, complementado por análise comparativa das características histológicas do melanoma oral murino e canino.

3.4 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Para fins de mortalidade foram incluídos todos os animais. Para análise macroscópica e análise estatística foram excluídos os camundongos que entraram em óbito antes do período determinado para eutanásia (n=9), bem como aqueles em cujas peças anatomopatológicas não descalcificaram por completo (n=19).

3.5 AMOSTRAS DE MELANOMA ORAL CANINO

Após preparo e análise das lâminas de histologia, foram excluídas as amostras que apresentavam histologia compatível com melanoma amelanico (n=5).

3.6 EXPERIMENTO

Estudaram-se 30 camundongos *Mus musculus*, *Rodentia Muridae*, da linhagem C57Bl/6J, machos, com peso entre 20 e 30,3 gramas, e idade entre 30 e 60 dias.

O camundongos foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, em *racks* ventilados, divididos em grupos de cinco animais, sob condições padrão para a linhagem – temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), umidade controlada, ciclos diários 12/12 horas claro/escuro, sendo ofertados: alimentação padrão e água *ad libitum*.

3.6.1 Cultivo das células tumorais

A linhagem de células B16F10 (melanoma murino) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa (37°C) com atmosfera de 5% de dióxido de carbono, até a confluência.

3.6.2 Implante de células tumorais

Para implante de células tumorais, seguiu-se o seguinte protocolo:

- a. Contenção dos animais para aplicação de anestesia (Cloridrato de Cetamina, um anestésico dissociativo, na dose de 100 mg/kg e do Cloridrato de Xilazina, um agonista α -2adrenérgico, 10 mg/kg), por via intraperitoneal.
- b. Injeção infiltrativa das células tumorais B16F10 na porção vestibular da gengiva ventral, mediante abertura da rima oral.
- c. Após o procedimento, os animais foram devolvidos aos racks ventilados para recuperação anestésica.

Foram realizadas induções tumorais em dois grupos, divididos conforme a concentração celular utilizada na injeção infiltrativa (CEUA-004/2016):

- 15 camundongos receberam 0,1 ml contendo 5×10^4 células de melanoma murino B16F10;
- 15 camundongos receberam 0,1 ml contendo 1×10^4 células de melanoma murino B16F10;

Após a indução tumoral, seguiu-se com as eutanásias (por deslocamento cervical) programadas aos sétimo, décimo quarto e vigésimo-primeiro dias de pós-operatório, para cada subgrupo (TABELA 1).

TABELA 1 : Grupos de experimentação

Número de Células Implantadas	Eutanásia no 7º DPO (n)	Eutanásia no 14º DPO (n)	Eutanásia no 21º DPO (n)	TOTAL (n)
5x10 ⁴ células	5	5	5	15
1x10 ⁴ células	5	5	5	15
TOTAL (n)	10	10	10	30

3.6.3 Técnica de Ressecção Hemicabeça Direita em *Mus musculus*

Após eutanásia por deslocamento cervical, os camundongos foram posicionados em decúbito dorsal e com o pescoço estendido. Convencionou-se incisão mediana, com lâmina de bisturi número 15, em pele da região cervical para facilitar a exposição da formação tumoral e estruturas adjacentes. A pele foi divulsionada do subcutâneo, e prosseguiu-se com a secção de mucosa oral a nível de incisivos inferiores, músculos e mandíbula, prosseguindo cranialmente e caudalmente (conforme a extensão tumoral), respeitando as margens de 1 a 2 cm de tecido mole normal e osso em todas as bordas. A secção foi realizada em linha média, a fim de se obter a hemicabeça direita do animal. Tesoura de Mayo, reta e romba foi utilizada. Para tecidos moles, tesoura de Metzenbaum Reta. Finalizada a técnica de ressecção direita de hemicabeça, a amostra era analisada quanto as características macroscópicas, e fixada em formol 10%.

3.6.4 Caracterização macroscópica do modelo de Melanoma Oral Murino

A macroscopia dos tumores foi analisada *post-mortem* em relação ao tipo da formação, dimensões, coloração, presença de ulceração e regularidade das bordas.

3.6.5 Exame Histopatológico

3.6.5.1 Melanoma oral murino

As peças compreenderam a lesão e as margens de tecido adjacente, fixadas em formalina (37%) diluída a 10%, em fragmentos de no máximo 4 centímetros. O tempo para fixação correspondeu de 8 a 48 horas. Posteriormente realizou-se a descalcificação das hemicabeças com EDTA. A desidratação dos materiais foi obtida

através de tempos determinados em soluções alcoólicas com concentrações crescentes de álcool (de 70% ao absoluto), e em seguida dois banhos de xilol. Após essa etapa, ocorreu inclusão em parafina fundida em estufa a 60°C, e montagem dos blocos para corte. Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo com espessura de 5 µm e a coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE).

Para realização das análises histológicas descritivas e morfométricas, utilizou-se o microscópio Olympus Bx41 acoplado a um sistema digital de captura DP-Controller para obtenção de imagens correspondentes a 12 campos visuais por lamina, quando possível.

Para Histologia Descritiva observaram-se os seguintes critérios: invasão tumoral em tecidos adjacentes; presença de grânulos de melanina; tipo celular observado (células arredondadas, alongadas ou ambas- mistas); características do citoplasma, núcleo e nucléolo; grau infiltrado inflamatório.

A Análise Morfométrica quantificou as áreas de vascularização e necrose de 12 campos por lamina, em comparação a área total do campo. Para tal medição, utilizou-se o software Image J (NHI Program).

3.6.5.2 Melanoma oral canino

Foram analisadas laminas obtidas a partir de blocos de parafina de 19 casos de melanoma oral canino atendidos no Hospital Veterinário - FCAV/UNESP Jaboticabal, de 2013 a 2016.

Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo com espessura de 5 µm e a coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE).

Para realização das análises histológicas descritivas e morfométricas, utilizou-se microscópio Olympus Bx41 acoplado a um sistema digital de captura DP-Controller para obtenção de imagens correspondentes a 12 campos visuais por lamina, quando possível.

Para Histologia Descritiva observaram-se os seguintes critérios: invasão tumoral em tecidos adjacentes; presença de grânulos de melanina; tipo celular observado (células arredondadas, alongadas ou ambas- mistas); características do citoplasma, núcleo e nucléolo; grau infiltrado inflamatório.

A Análise Morfométrica quantificou as áreas de vascularização e necrose de 12 campos por lamina, em comparação a área total do campo. Para tal medição, utilizou-se o software Image J (NHI Program).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabulados em software MS Excel 2007 e depois transportados para análise estatística no software Bioestat 5.3 (Ayres et al. 2007).

Após a exclusão dos indivíduos que foram a óbito antes do período determinado para eutanásia, obteve-se um número de indivíduos na amostra (n) de 21.

A estatística descritiva dos dados foi expressa por médias, medianas, valores mínimos e máximos e desvios padrões quanto a análise do volume tumoral. Para todos os testes estatísticos, valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

A possibilidade de correlação entre os volumes médios de cada grupo, em relação ao momento da eutanásia foi testada pelo teste de Correlação de Spearman.

A normalidade da amostra foi analisada pelo teste de Lilliefors. A variância foi analisada pelo Teste Q de Cochran.

Para análise quantitativa de comparação dos volume tumorais em relação aos dias de eutanásia (D7, D14 e D21) em ambos os grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

Para comparação dos volumes tumorais em relação a quantidades de células injetadas (grupos 1 e 2), para cada subgrupo de eutanásia, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

Para Análise Qualitativa, os dados correspondentes as características macroscópicas do melanoma oral murino foram transformados em qualitativos ordinais, e as hipóteses foram testadas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e pós-teste de Dunn. Após, para as comparações com diferença significativa, foram testadas para possibilidade de correlação pelo teste não-paramétrico de Spearman.

5 RESULTADOS

O resultado está organizado em um capítulo correspondente ao artigo científico:

5.1 CAPÍTULO I

Desenvolvimento e avaliação comparativa do melanoma oral em camundongos, frente sua ocorrência espontânea em cães

5.1 CAPÍTULO I

Desenvolvimento e avaliação comparativa do melanoma oral em camundongos, frente sua ocorrência espontânea em cães

RESUMO

Introdução: O Melanoma é a principal neoplasia em cavidade oral de cães domésticos. Ocorre principalmente em gengiva, e caracteriza-se pela progressão acelerada, altos índices de recidiva, metástase e resistência a terapias propostas. Tais aspectos impulsionaram o presente estudo, considerando a ausência de um modelo experimental para essa neoplasia, que possibilite a realização de ensaios pré-clínicos. **Objetivos:** Induzir a formação de melanoma oral murino em camundongos C57Bl/6J, e estudar suas características macroscópicas e histopatológicas. **Método:** trata-se de um estudo experimental. Trinta camundongos C57Bl/6J (*Mus musculus*) foram submetidos a indução tumoral através da injeção de células da linhagem de melanoma murino B16F10 em gengiva inferior direita porção vestibular, em duas concentrações celulares, originando dois grupos distintos: Grupo 1 (n=15) que receberam 0,1 ml contendo 1×10^4 células de melanoma murino B16F10; Grupo 2 (n=15) que receberam 0,1 ml contendo 5×10^4 células de melanoma murino B16F10. Para ambos os grupos foram realizadas eutanásias programadas aos sétimo, décimo quarto e vigésimo-primeiro dias de pós-operatório, com ressecção ex-vivo da hemicabeça direita. Após a exclusão dos indivíduos que foram a óbito antes do período determinado para eutanásia, obteve-se um número de indivíduos na amostra (n) de 21. Foi realizada análise macroscópica das formações tumorais. Para o estudo histológico comparativo, analisaram-se amostras de melanoma oral canino melânico (n=15) no que tange aos aspectos morfométricos e morfológicos. **Resultados:** Houve diferença no desenvolvimento tumoral para cada concentração celular utilizada na indução. Notou-se correlação positiva entre volume tumoral e número de células. **Conclusão:** A indução de melanoma oral em camundongos para fins de modelo de estudo pré-clínico para cães se mostrou uma alternativa útil, viável e reproduzível.

Palavras-chave: Melanoma oral. Melanoma canino. Melanoma murino.

INTRODUÇÃO

O Melanoma Oral é uma neoplasia de melanoblastos e melanócitos (SILVA et al., 2006). Foi primeiramente relatado por Bunker, em 1882 (CAMARGO et al., 2008).

Caracteriza-se como a principal neoplasia em cavidade oral em cães, sendo a gengiva o local de predileção (GIOSO, 2005). Apresenta elevada prevalência, incidência (BERGMAN, 2007) e progressão altamente agressiva (POORMAN et al., 2014). É pouco responsivo a terapias adjuvantes (BERGMAN, 2012). Há controvérsias quanto a resposta a imunoterapias, já que os estudos realizados não eram randomizados e prospectivos, e se notou variação de efeito conforme nível de tirosinase do tumor (melânico e amelanico) (TREGGIARI; GRANT E NORTH, 2016).

A analogia do desenvolvimento de melanoma oral canino e humano (MACEWEN, 1990; SPANGLER; KASS, 2006), tem limitações devido a diferenças anatômicas e biológicas que geram variações de prevalência entre essas espécies. O Melanoma Oral Canino é considerado modelo clínico para melanoma mucoso humano, pela semelhança comportamental e histopatológica, não havendo evidências concretas de similitude genética para as neoplasias. Diferem em prevalência, sendo essa superior em cães. A justificativa que norteia essa comparação é que em cães a doença também ocorre espontaneamente (SIMPSON et al., 2013).

Modelos de estudo de melanoma possibilitam analisar fatores pertinentes ao seu desenvolvimento e desencadeamento, direcionando estratégias de tratamento e controle. As linhagens de células de melanoma permitem, através do cultivo tumoral e indução em animais, estudar desde a progressão de melanomas primários até surgimento de metástases. Bons modelos experimentais apresentam crescimento em matriz tridimensional, mimetizando as lesões teciduais nos pacientes, a exemplo do modelo de melanoma em animais imunodeficientes de experimentação como o camundongo C57Bl/6J (HERLYN; KALABIS, 2010). Os modelos objetivam compreender a relação genótipo-fenótipo para essa neoplasia, produzir ensaios pré-clínicos, analisar as mutações causais, a progressão da doença e o efeito de terapias moleculares específicas (SANTIAGO-WALKER; HAASS; HERLYN, 2009).

O melanoma murino B16 é o segundo modelo mais utilizado para a doença em pele. Foi isolado a partir de melanoma que se desenvolveu espontaneamente em camundongos C57BL/6 (FIDLER, 1973), existindo variedades de F1 a F10, conforme a capacidade metastática. A variante F10 foi obtida por Fidler e Nicolson (1976) após dez injeções em veia caudal dessa linhagem em camundongos, e colheita de células metastáticas no pulmão. Caracteriza-se pela intensa pigmentação, crescimento rápido *in vitro* e *in vivo* e alta capacidade metastática, com óbito decorrente da progressão tumoral em média de 15 a 30 dias. Possui consideráveis diferenças fenotípicas para com o melanoma cutâneo humano relacionadas ao desencadeamento tumoral, a exemplo da atividade mutacional em BRAF, e a manifestações epidérmicas comuns nos seres humanos e incomuns em melanoma murino (DANKORT et al., 2009). Isso limita seu poder como modelo experimental único para essa espécie, ainda sendo relevante para analisar os fatores desencadeantes do melanoma (WALKER et al., 2011), mas abre possibilidades para estudo comparativo e pré-clínico com outra espécie animal, os cães.

A possibilidade de indução de melanoma em cavidade oral de camundongos através da linhagem de células de melanoma murino B16, e o desenvolvimento de um modelo murino para essa neoplasia impulsionaram o presente estudo. A alta casuística, progressão acelerada, bem como a ausência de medidas terapêuticas consideráveis para controle do Melanoma Oral Canino vislumbram a necessidade de um modelo para realização de ensaios pré-clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental para desenvolvimento e caracterização de modelo de estudo de Melanoma Oral em camundongos.

A experimentação animal foi realizada no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As amostras foram processadas e analisadas no laboratório de Histologia da UEPG.

Animais de Experimentação

Estudaram-se 30 camundongos (*Mus musculus*, *Rodentia Muridae*), da linhagem C57Bl/6J, machos, com peso entre 20 e 30,3 gramas, e idade entre 30 e 60 dias, da linhagem C57Bl/6J, submetidos a implante de células tumorais da linhagem B16F10 (melanoma murino), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, registrado sob os seguintes protocolos: 8398/2015 e 674/2016.

O camundongos foram mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, em *racks* ventilados, divididos em grupos de cinco animais, sob condições padrão para a linhagem – temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$), umidade relativa do ar controlada, ciclo claro e escuro definidos em 12/12 horas, sendo ofertados: alimentação padrão e água *ad libitum*.

A linhagem de células B16F10 (melanoma murino) foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa (37°C) com atmosfera de 5% de dióxido de carbono, até a confluência.

Para avaliação da mortalidade, foram incluídos todos os animais. Para fins de análise estatística foram excluídos os camundongos que entraram em óbito antes do período determinado para eutanásia ($n=9$), bem como aqueles em cujas peças anatomopatológicas não descalcificaram por completo ($n=28$).

Implante de células tumorais

Para implante de células tumorais, seguiu-se o seguinte protocolo:

- a. Contenção dos animais para aplicação de anestesia (Cloridrato de Cetamina, um anestésico dissociativo, na dose de 100 mg/kg e do Cloridrato de Xilazina, um agonista α -2adrenérgico, 10 mg/kg), por via intraperitoneal.
- b. Injeção das células tumorais B16F10 na porção vestibular da gengiva ventral, mediante abertura da rima oral (Fig 2).
- c. Após o procedimento, os animais foram devolvidos aos *racks* ventilados para recuperação anestésica.

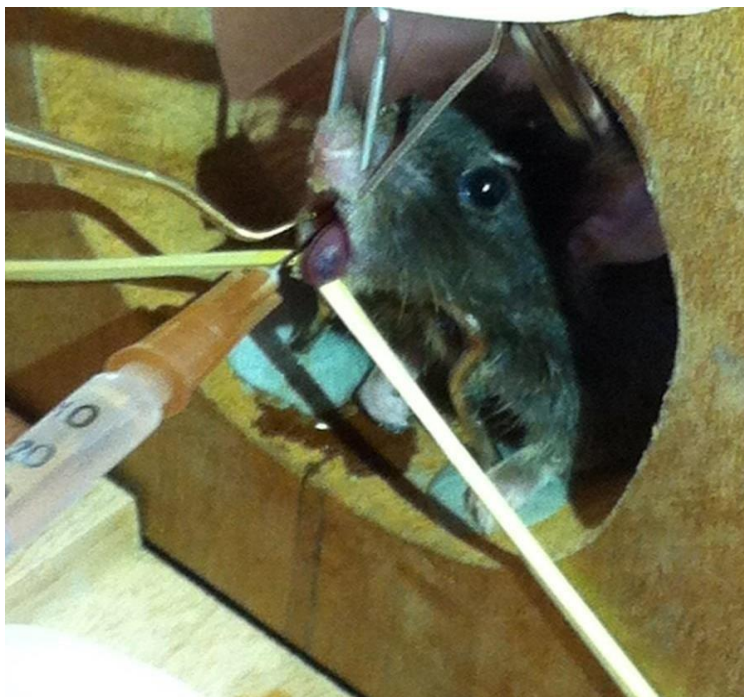


Figura 1: Injeção das células tumorais B16F10 na porção vestibular da gengiva ventral, mediante abertura da rima oral, com o animal sob anestesia. (FONTE: O AUTOR)

Foram realizadas induções tumorais em dois grupos, divididos conforme a concentração celular utilizada na injeção infiltrativa (CEUA-004/2016):

- Grupo 1: 15 camundongos receberam 0,1 ml contendo 5×10^4 células de melanoma murino B16F10;
- Grupo 2: 15 camundongos receberam 0,1 ml contendo 1×10^4 células de melanoma murino B16F10;

Após a indução tumoral, foram realizadas eutanásias programadas aos sétimo, décimo quarto e vigésimo-primeiro dias de pós-operatório (QUADRO 1).

TABELA 1: Grupos de Experimentação

Grupos	Número de Células Implantadas	Eutanásia no 7º DPO (n)	Eutanásia no 14º DPO (n)	Eutanásia no 21º DPO (n)	TOTAL (n)
1	5×10^4 células	5	5	5	15
2	1×10^4 células	5	5	5	15
	TOTAL (n)	10	10	10	30

A amostra para análise histopatológica foi coletada *post-mortem* através de ressecção cirúrgica da hemicabeça direita dos murinos estudados. Cortes totais da hemicabeça foram obtidos, quando possível, para análises macro e microscópica da neoplasia.

Análise Comparativa ao Melanoma Oral Canino

Foram analisadas lâminas obtidas a partir de blocos de parafina de 19 casos de melanoma oral canino atendidos no Hospital Veterinário - FCAV/UNESP Jaboticabal, de 2013 a 2016.

Os cortes histológicos foram feitos em micrótomo com espessura de 5 μ m e a coloração utilizada foi a Hematoxilina-Eosina (HE).

Para realização das análises histológicas descritivas e morfométricas, utilizou-se microscópio Olympus Bx41 acoplado a um sistema digital de captura DP- Controller para obtenção de imagens correspondentes a 12 campos visuais por lamina, quando possível.

Para Histologia Descritiva observaram-se os seguintes critérios: invasão tumoral em tecidos adjacentes; presença de grânulos de melanina; tipo celular observado (células arredondadas, alongadas ou ambas- mistas); características do citoplasma, núcleo e presença infiltrado inflamatório.

A Análise Morfométrica quantificou as áreas de vascularização e necrose de 12 campos por lâmina, em comparação a área total do campo. Para tal medição, utilizou-se o software Image J (NHI Program).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram tabulados em software MS Excel 2007 e depois transportados para análise estatística no software Bioestat 5.3 (Ayres et al. 2007).

Após a exclusão dos indivíduos que foram a óbito antes do período determinado para eutanásia, obteve-se um número de indivíduos na amostra (n) de 21.

A estatística descritiva dos dados foi expressa por médias, medianas, valores mínimos e máximos e desvios padrões quanto a análise do volume tumoral. Para todos os testes estatísticos, valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística.

A possibilidade de correlação entre os volumes médios de cada grupo, em relação ao momento da eutanásia foi testada pelo teste de Correlação de Spearman.

A normalidade da amostra foi analisada pelo teste de Lilliefors. A variância foi analisada pelo Teste Q de Cochran.

Para análise quantitativa de comparação dos volume tumorais em relação aos dias de eutanásia (D7, D14 e D21) em ambos os grupos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

Para comparação dos volumes tumorais em relação a quantidades de células injetadas (grupos 1 e 2), para cada subgrupo de eutanásia, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

Para Análise Qualitativa, os dados correspondentes as características macroscópicas do melanoma oral murino foram transformados em qualitativos ordinais, e as hipóteses foram testadas utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, e pós-teste de Dunn. Após, para as comparações com diferença significativa, foram testadas para possibilidade de correlação pelo teste não- paramétrico de Spearman.

RESULTADOS

Dos 30 camundongos submetidos ao implante de células tumorais de melanoma murino, dezoito animais desenvolveram o tumor visivelmente e três não desenvolveram (Grupo 2). Nove animais foram a óbito (tabela 2) antes dos períodos para eutanásia determinados para cada grupo, um no grupo 1(antes de sete dias), dois no grupo 1 (antes de quatorze dias), três no grupo 1 (antes dos vinte e um dias), três no grupo 2 (antes dos vinte e um dias).

TABELA 2 : Grupos e subgrupos de experimentação. Sobreviventes ao final do experimento.

Grupo	Eutanásia	n(inicial)	Óbitos precoces	N(final)
1	7	5	1	4
	14	5	2	3
	21	5	3	2
2	7	5	0	5
	14	5	0	5
	21	5	3	2
N(total)	--	30	9	21

Após eutanásia em tempo determinado, cada animal foi avaliado quanto a presença de tumor visível (n=18), sendo esses tumores medidos (Fig 2; fig 3), calculados os volumes em mm³ [Volume Tumoral = (menor dimensão)² × (maior dimensão)/ $\frac{3}{4} \pi R$] (Tabela 3; Figura 1) (NOVAK et al., 2003), e comparados em momentos diversos (Tabela 4).

TABELA 3 : Volume tumoral nos grupos e subgrupos do estudo experimental.

Grupos	Tempo eutanásias		
	7 dias	14 dias	21 dias
1	0.019	1.406	1.198
1	0.005	--	3.370
1	0.004	1.123	--
1	0.046	--	--
1	--	1.258	--
2	0.001	0.001	0.780
2	0.000	0.017	0.187
2	0.001	0.003	--
2	0.002	0.000	--
2	0.000	0.028	--

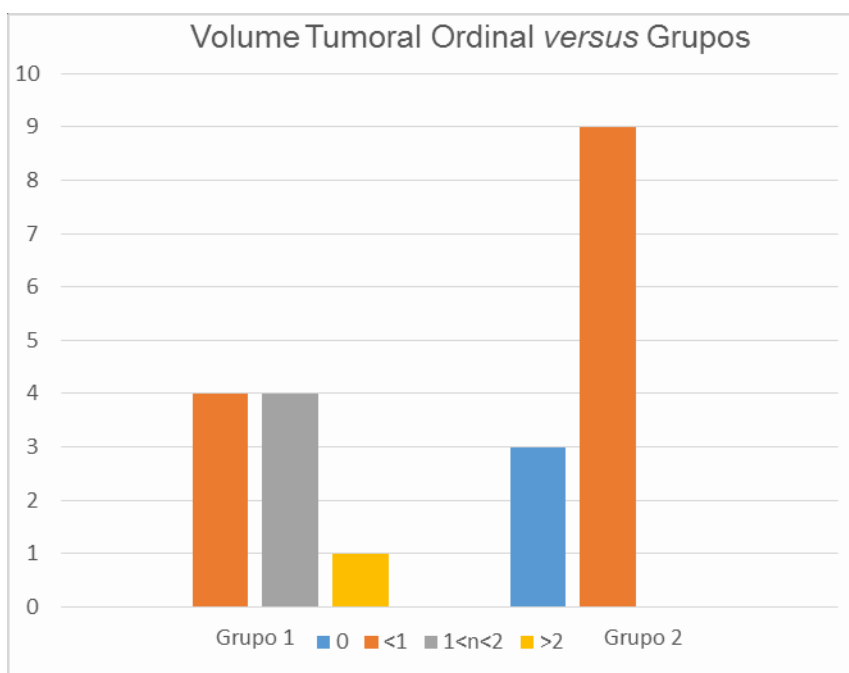


Figura 1 : Figura para dados qualitativos ordinais de volume tumor em seus respectivos grupos de experimentação.

Exemplos da manifestação tumoral nos respectivos grupos encontram-se nas imagens a seguir (Figuras 2 e 3):



Figura 2 : Exemplos de aspecto tumoral em sete (A), quatorze (B) e vinte e um dias (C) após indução respectivamente, para Grupo 1. (ESCALA: 1cm)

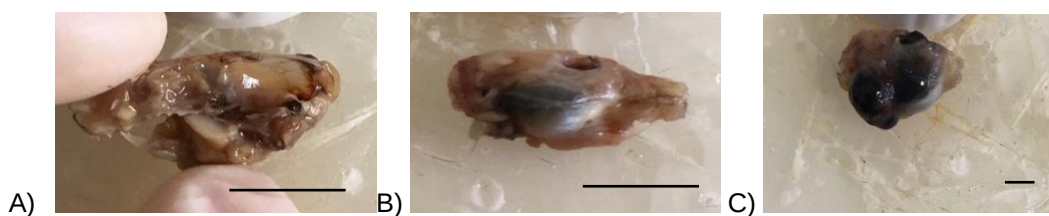


Figura 3 : Exemplos de aspecto tumoral em sete (A), quatorze (B) e vinte e um dias (C) após indução respectivamente, para Grupo 2. (ESCALA: 1mm)

TABELA 4 : Comparação de volumes tumorais em momentos diversos, parte 1.

Variável	Grupos	N	Média	1º Q	3º Q	Mediana	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mín	Máx
	1	4	0.0287	0.0150	0.0460	0.0322	0.0212	0.0106	0.0036	0.0468
Volume mm ³		3	1.2626	1.1908	1.3322	1.2584	0.1415	0.0817	1.1232	1.4061
		2	2.2838	1.7410	2.8267	2.2838	1.5355	1.0858	1.1981	3.3696
Volume mm ³	2	5	0.0009	0.0005	0.0010	0.0005	0.0006	0.0003	0.0005	0.0016
		5	0.0120	0.0021	0.0195	0.0096	0.0129	0.0065	0.0005	0.0281
		2	0.4836	0.3354	0.6318	0.4836	0.4192	0.2964	0.1872	0.078

COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS DE AVALIAÇÃO EM CADA UM DOS GRUPOS

Para o volume tumoral em cada um dos grupos e subgrupos divididos conforme dias de eutanásia (7, 14 e 21), foi verificada a hipótese nula de resultados iguais nos três momentos de avaliação (conforme momento eutanásia) *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um momento de avaliação com resultados diferentes dos demais. Após análise de normalidade e variância, foi utilizado o teste de Kruskal - Wallis com teste ad hoc de Dunn. Houve diferença significativa entre os subgrupos em relação ao dia de eutanásia ($p=0.0415$), confirmada pelo pós-teste entre os subgrupos (para Grupo 1 e 2) eutanasiados no 7º e 21º dias ($p<0.05$) (Tabela 5).

TABELA 5 : Comparação dos volumes tumorais nos diversos momentos, parte 2.

Variável	Subgrupos	N	Valor de p^* (Método de Dunn)		
			Grupos		
			7º e 14º	7º e 21º	14º e 21º
Volume	7º dias	9			
Tumoral	14º dias	8	ns ¹	$p<0.05$	ns ¹
	21º dias	4			

(*)Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p<0.05$.

(1) diferença não significativa entre os grupos ($p>0.05$)

Para o volume tumoral em cada um dos grupos (1 e 2) e subgrupos (para 7, 14 e 21 dos grupos 1 e 2), foi verificada a hipótese nula de resultados iguais em todos os momentos de avaliação *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um momento de avaliação com resultados diferentes dos demais. Após análise de normalidade e variância, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com ad hoc de Dunn. Houve diferença significativa entre os subgrupos em relação ao dia de eutanásia ($p=0.0050$), confirmada pelo pós-teste entre os subgrupos G1 14º e G2 7º ($p<0.005$), G1 21º e G2 7º ($p<0.05$) (Tabela 6).

TABELA 6 : Comparação dos volumes tumorais em diversos momentos, parte 3.

Variável	Grupos	Subgrupos eutanásias(dias)	Método de Dunn ($p<0.05$)*
Volume Tumoral	1	7°	G1 14° e G2 7° *
		14°	
		21°	
	2	7°	G1 21° e G2 7° *
		14°	
		21°	

(*)Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, $p<0.05$.

As médias dos volumes tumorais (Tabela 4) para os grupos 1 e 2 foram demonstradas na forma de gráfico (Figura 2). Nele, observa-se que o aumento de volume tumoral no G1 foi mais representativo e rápido que no Grupo 2. A fim de verificar se há correlação entre as médias dos volumes tumorais e o tempo de desenvolvimento, foi aplicado o Teste de Correlação Não-Paramétrico de Spearman, o qual demonstrou correlação forte positiva ($r_s=1$; $p<0.0001$) ($p<0.0001$) (tabela 7).

Figura 2: Gráfico para médias de volume tumoral versus tempo de desenvolvimento.

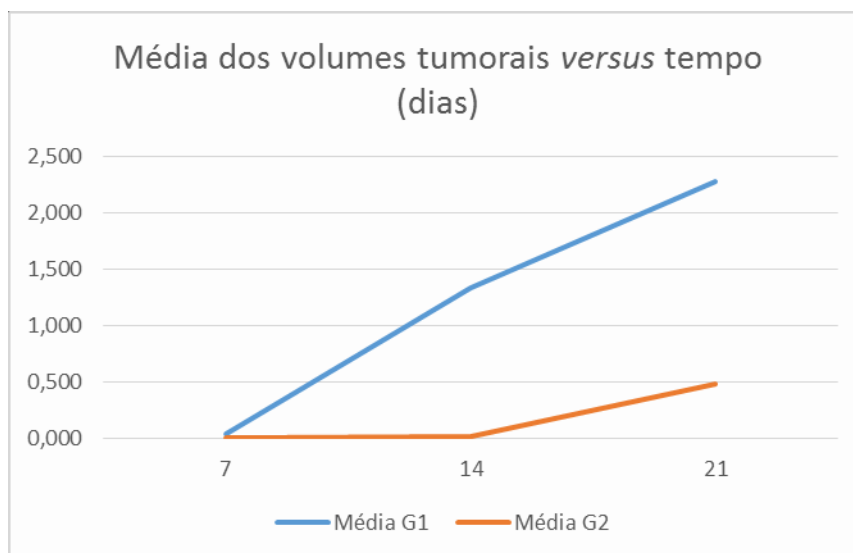


TABELA 7 : Correlação entre os volumes tumorais em momentos diferentes.

Variáveis	Médias dos Grupos			rs ¹	Valor de p*
		1	2		
Volume tumoral mm3	7	0.0628	0.001		
Número de células	14	2.8667	0.0444	1	p<0.0001
	21	4.8600	1.425		

(*)Teste de Correlação Não-Paramétrico de Spearman

(1)Coeficiente de Correlação de Spearman

COMPARAÇÃO DOS MOMENTOS DE AVALIAÇÃO EM CADA UM DOS GRUPOS

Após eutanásias em tempos determinados, foi realizada a ressecção das hemicabeças direitas, bem como medidas as dimensões tumorais para cálculo dos volumes. Tomou-se nota do tipo de formação tumoral (mácula ou massa), coloração (avermelhada, marrom ou negra), aspecto das margens quanto a regularidade (regular ou irregular) e ulceração (presença ou ausência). As variáveis qualitativas nominais (tipo de formação, coloração, regularidade margens) e quantitativa contínua (volume) foram transformadas em qualitativas ordinais, a fim de se realizar análises qualitativas. Para tais variáveis, foi verificada a hipótese nula de resultados iguais em todos os momentos de avaliação *versus* a hipótese alternativa de pelo menos um momento de avaliação com resultados diferentes dos demais. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com teste ad hoc de Dunn. Houve diferença significativa entre as variáveis analisadas ($p<0.0001$). O pós- teste de Dunn mostrou diferença entre: tipo de formação e ulceração ($p<0.05$); volume tumoral e coloração ($p<0.05$); volume tumoral e ulceração ($p<0.05$); coloração e ulceração ($p<0.05$); regularidade de margens e ulceração ($p<0.05$) (tabela 8).

TABELA 8 : Transformação das variáveis em qualitativas ordinais

Tipo de Formação		Volume		Coloração		Margens		Ulceração	
NDN	0	0	0	NDN	0	NDN	0	Não	0
Mácula	1	0<x>1	1	Avermelhada	1	Regular	1	Sim	1
Massa	2	1<x>2	2	Marrom	2	Irregular	2		
		>2	3	Negra	3				

Para as variáveis que obtiveram diferença estatística significativa, foi testada a presença de correlação através do Teste Não-Paramétrico de Spearman, e representados através de gráficos de dispersão:

Tipo de Formação e Ulceração

Houve correlação positiva entre o tipo de formação tumoral (mácula ou massa) e seu volume ($r_s = 0.6038$; $p < 0.037$). A ocorrência de ulceração esteve associada a de massa em todos os casos (Figura 3)

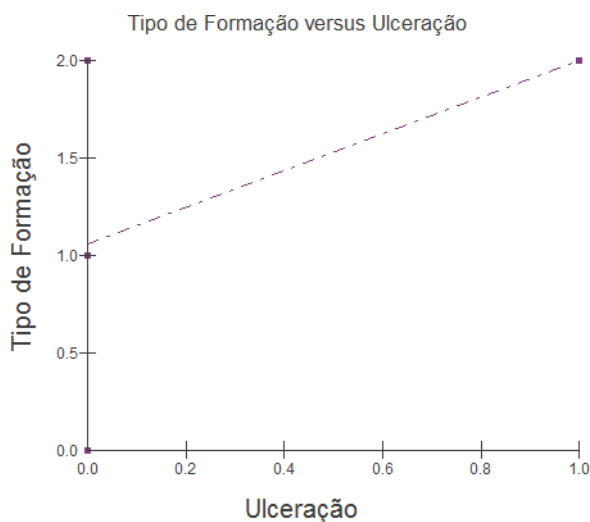


Figura 3: Gráfico de dispersão para dados qualitativos de tipo de formação versus ulceração.

Volume Tumoral e Coloração

Houve correlação positiva entre o volume tumoral e a coloração (avermelhada, marrom ou negra) ($r_s = 0.6671$, $p < 0.037$). A coloração negra esteve

associada a massa em todos os casos, e as colorações avermelhada e marrom associadas a mácula (Figura 4).

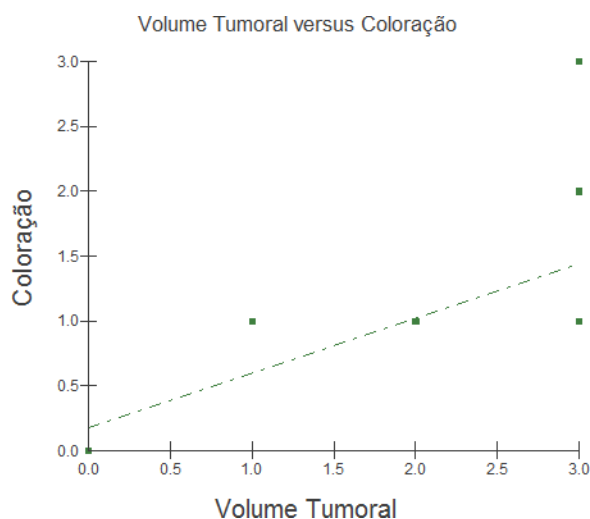


Figura 4: Gráfico de dispersão para dados qualitativos de volume tumoral *versus* coloração.

Volume Tumoral e Ulceração

Houve correlação positiva entre o volume tumoral e ulceração ($r_s=0.4889$; $p<0.0245$), visto que a ocorrência desta esteve associada ao crescimento tumoral vertical (Figura 5).

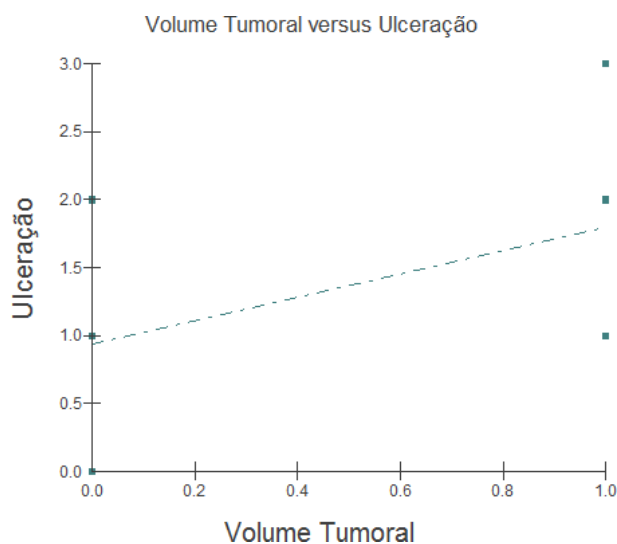


Figura 5: Gráfico de dispersão para dados qualitativos de volume tumoral *versus* ulceração.

Coloração e Ulceração

Houve correlação positiva entre a coloração e ulceração ($r_s=0.7002$; $p<0.0004$). A ocorrência de ulceração esteve associada a coloração negra tumoral (Figura 6).

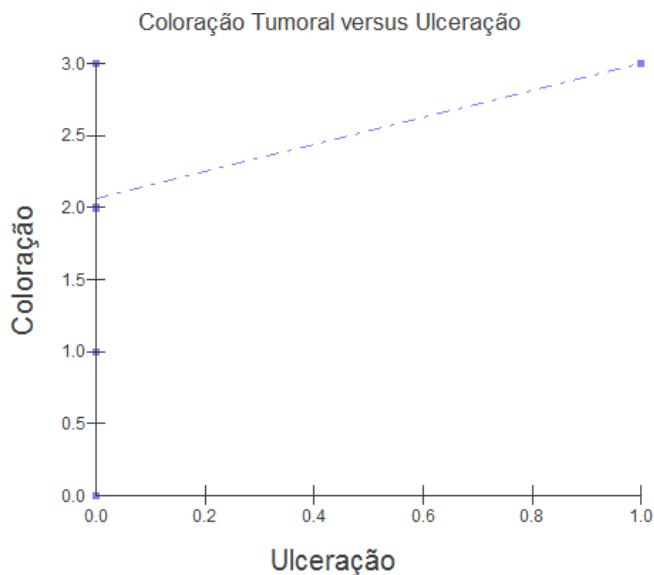


Figura 6: Gráfico de dispersão para dados qualitativos de coloração tumoral *versus* ulceração.

Regularidade de Margens e Ulceração

Houve correlação fraca entre a regularidade de margens e ulceração ($r_s=0.3491$; $p=0.1207$) (Figura 7).

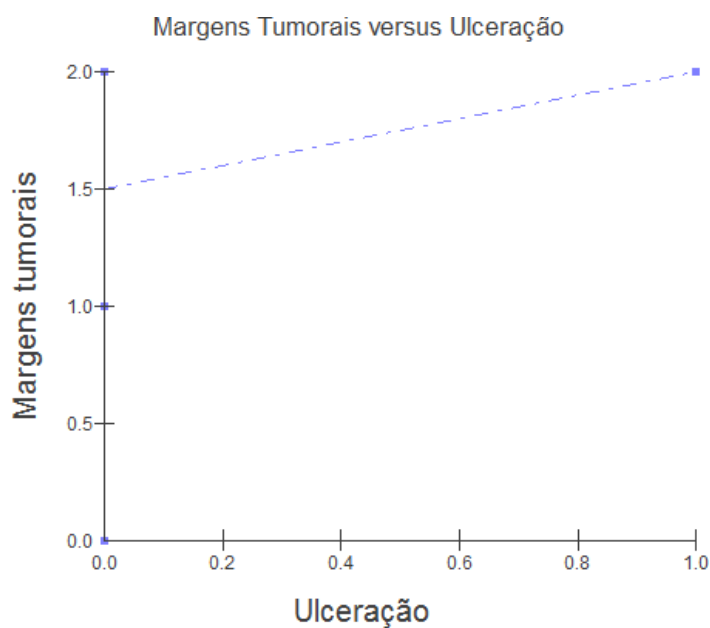


Figura 7: Gráfico de dispersão para dados qualitativos de margens tumorais *versus* ulceração.

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DO MELANOMA ORAL MURINO

A análise histopatológica correspondente ao crescimento tumoral de catorze dias para o Grupo 1, mostra presença de grânulos de melanina em tecido muscular, melanócitos em proliferação. A necrose por coagulação foi evidenciada pela redução da nitidez dos elementos nucleares, e calculou-se a necrose média para os 12 campos analisados, com 41.72%. Notou-se relativa perda de integridade e contorno regular dos vasos sanguíneos observados, com 0.49% de angiogênese média para os 12 campos analisados (Figura 4).

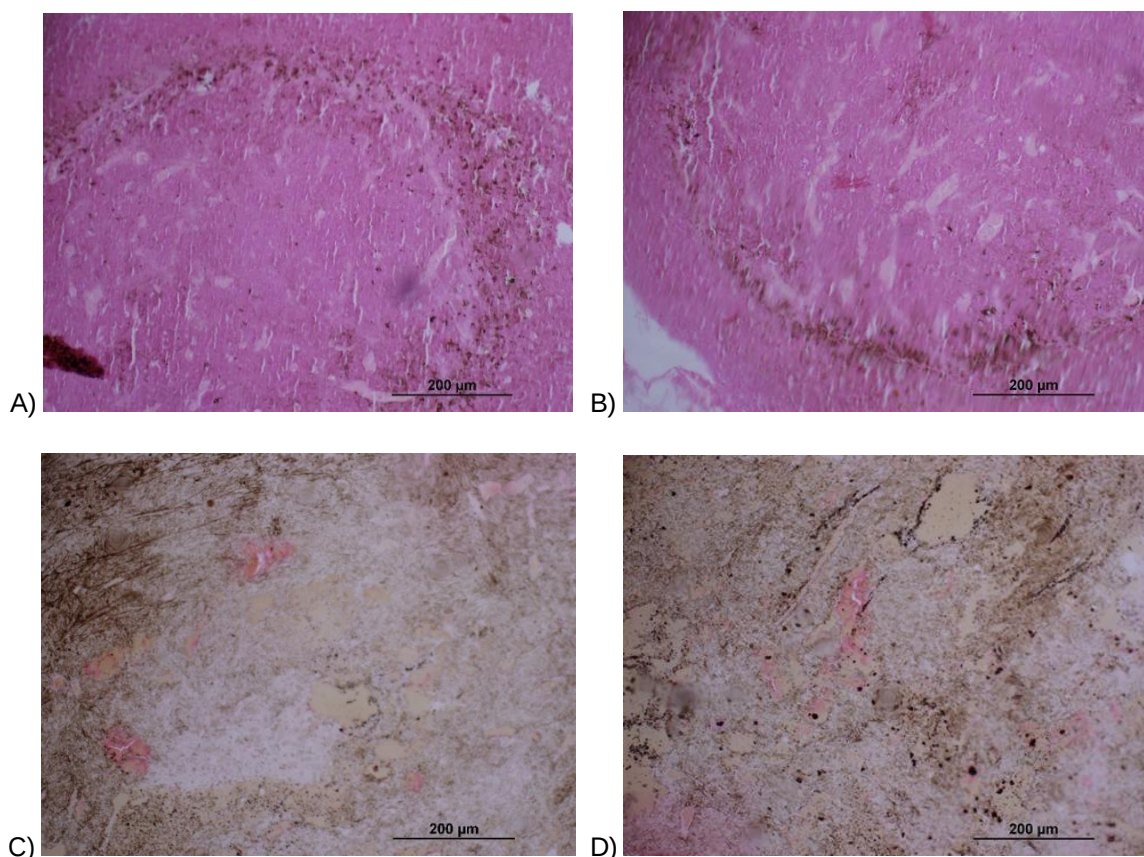


Figura 4 : Cortes histológicos de melanoma oral murino correspondentes ao 14° dia de desenvolvimento tumoral, Grupo 1. (A e B) Presença de grânulos de melanina e vasos sanguíneos. (C e D) Perda de integridade tecidual. Aumento da objetiva: 20x.

Aos 14° dias de desenvolvimento tumoral para o Grupo 2, nota-se aspecto celular misto, grânulos de melanina, intenso infiltrado inflamatório linfocitário e melanócitos em proliferação. A porcentagem de área necrótica em relação as 12 lâminas analisadas foi de 14,25%. Os vasos sanguíneos apresentaram perda da integridade de suas paredes, e a porcentagem de vascularização média foi de 1.19% (Figura 5).

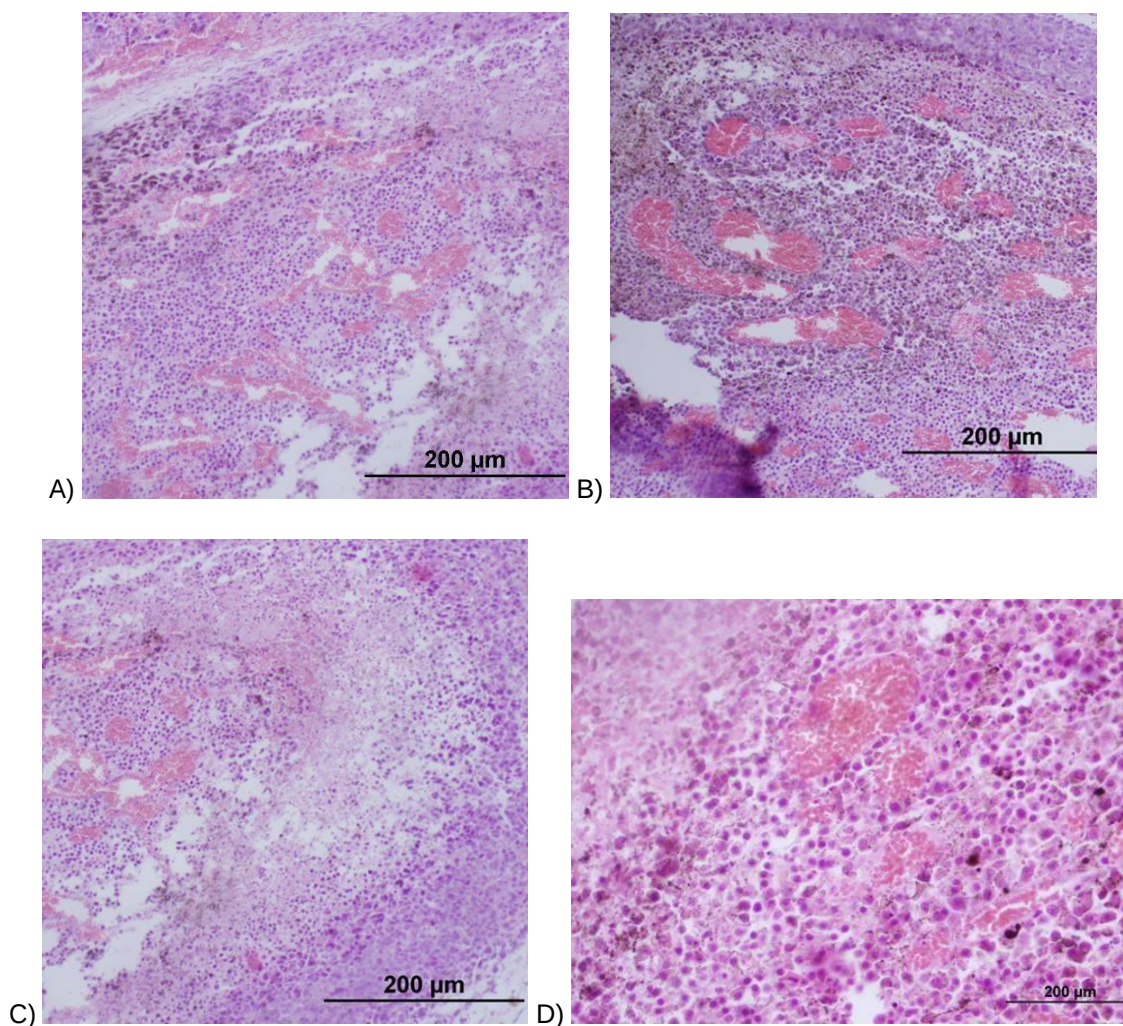


Figura 5 : Cortes histológicos de melanoma oral murino correspondentes ao 14º dia de desenvolvimento tumoral, Grupo 2. (A, B e C) Grânulos de melanina, vasos sanguíneos, perda de integridade tecidual podem ser observados. Aumento da objetiva de 20x. (D) Vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório. Aumento da objetiva de: 40x.

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DO MELANOMA ORAL CANINO

Dos 19 casos de Melanoma Oral Canino analisados, dois serão descritos a seguir, resumindo as características observadas nessa amostra da população:

A análise histopatológica denota a presença de melanócitos em proliferação, invadindo difusamente o tecido da amostra. As são de células de aspecto misto, com núcleo e citoplasma amplos. Há presença variada de grânulos de melanina e infiltrado inflamatório. A partir dos 12 campos analisados para este caso, foi calculada a média da porcentagem de necrose de 89.19%, e de vascularização de 1. 12% (Figura 6).

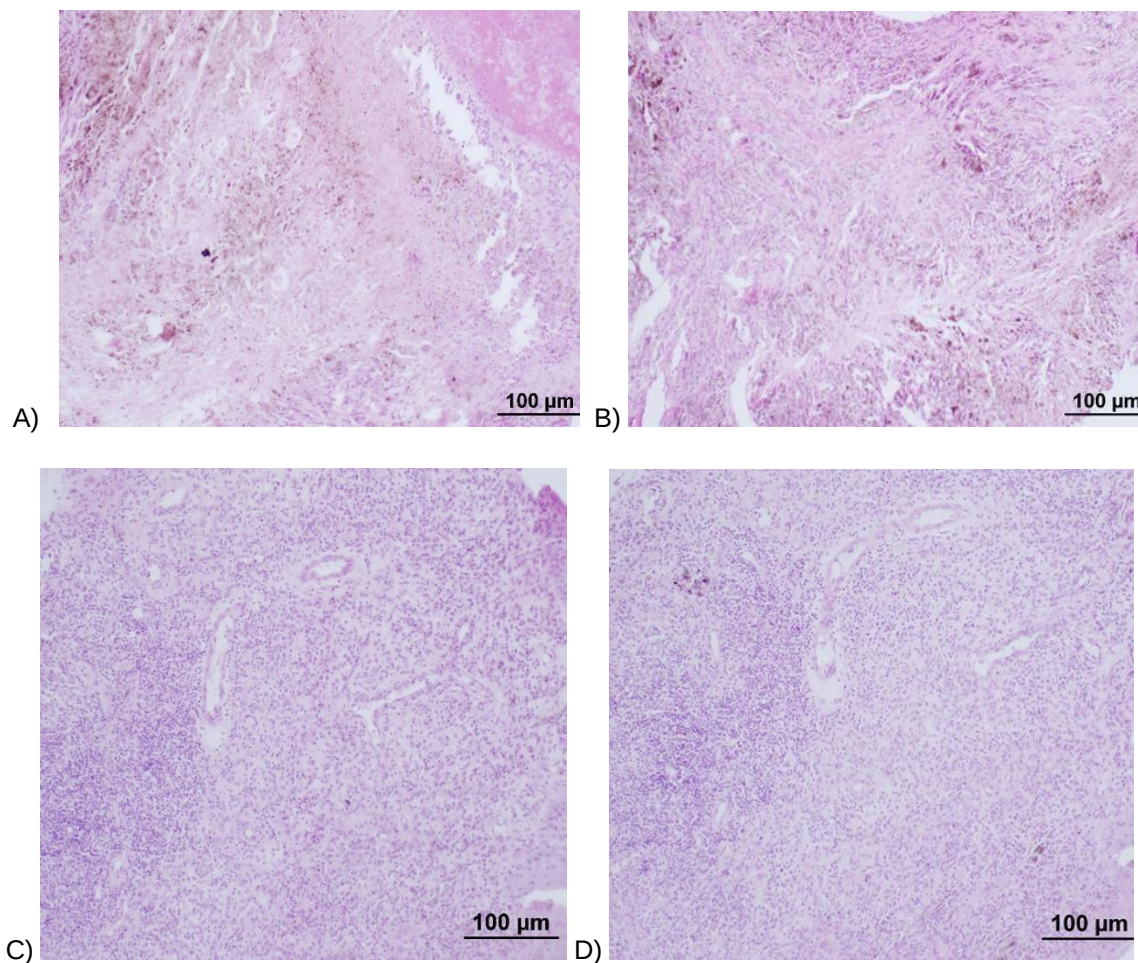
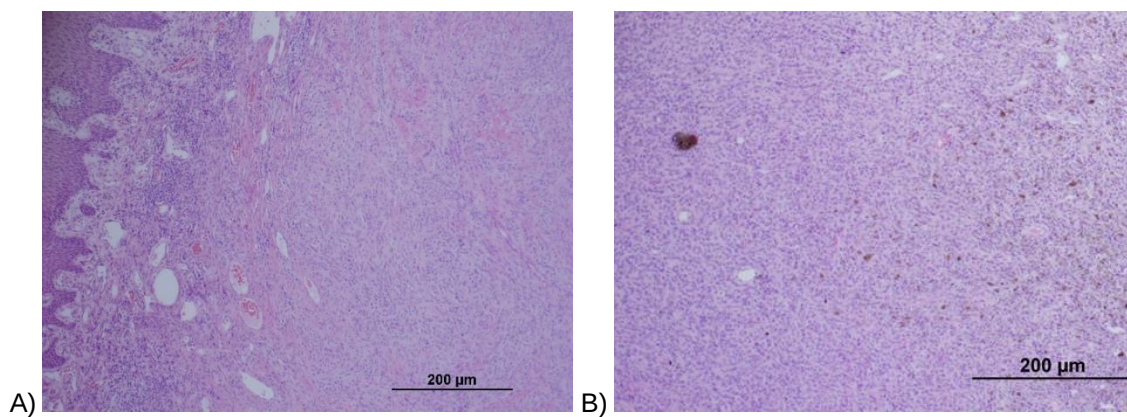


Figura 6 : Cortes histológicos de melanoma oral canino. (A e B) Grânulos de melanina e perda da integridade tecidual. (C e D) Necrose e vasos sanguíneos. Aumento da objetiva de 20x.

A Análise Histopatológica denota para presença de células melanocíticas em proliferação, com formato redondo e organizadas em ninhos. Possuem núcleos amplos, com variada quantidade de citoplasma. Há presença de grânulos de melanina. A partir dos 12 campos analisados para este caso, foi calculada a média da porcentagem de necrose de 15.50%, e de vascularização de 0.33% (Figura 7).



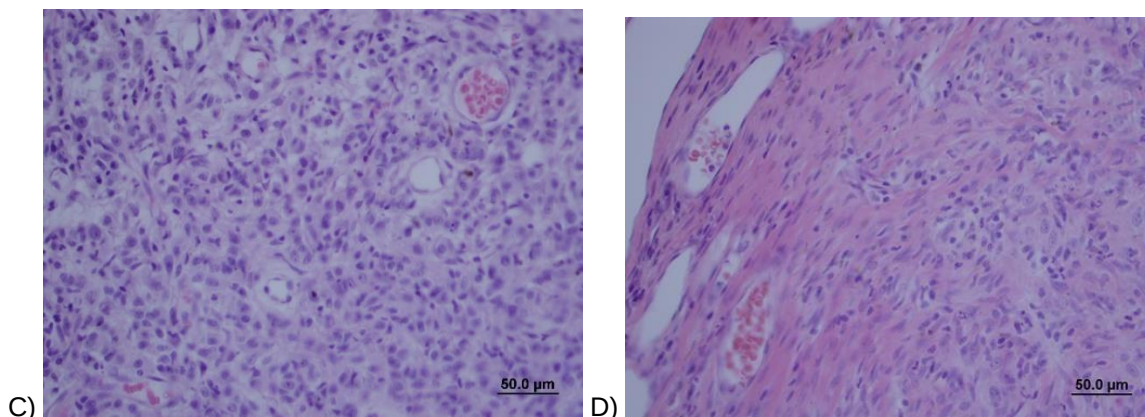


Figura 7 : Cortes histológicos de melanoma oral canino. (A e B) Áreas necróticas, presença de vasos sanguíneos e grânulos de melanina, Aumento da objetiva: 20x. (C e D) Células arredondadas formando feixes. Presença de infiltrado inflamatório. Perda da integridade tecidual. Aumento da objetiva: 100x e 40x.

DISCUSSÃO

Os grupos experimentais contaram com diferentes concentrações celulares para indução tumoral (5×10^4 células para Grupo 1 e 1×10^4 células para Grupo 2). O desenvolvimento tumoral do melanoma, bem como a agressividade são influenciadas não só pelo número de células injetado, como também uniformidade das preparações dos cultivos das linhagens celulares e aglomeração celular (FIDLER, 1973).

A taxa superior de mortalidade para o Grupo 1 (6 animais, em detrimento de 3 para o Grupo 2) pode ser justificável pela concentração celular superior inicial, acarretando em superior desenvolvimento e progressão tumoral.

A comparação entre os subgrupos demonstrou diferença significativa entre os volumes tumorais em sete e vinte e um dias de desenvolvimento neoplásico para os Grupos 1 e 2, sugerindo crescimento tumoral expressivo entre os tempos (Tabela 5).

Houve diferença significativa entre os volumes tumorais em sete dias de desenvolvimento tumoral (Grupo 1) e sete (Grupo 2), como também entre volumes tumorais em vinte e um dias de desenvolvimento (Grupo 1) e sete dias de desenvolvimento (Grupo 2) (Tabela 6), aceitando a hipótese alternativa de que há diferença no desenvolvimento tumoral para cada concentração celular utilizada na indução. Ratificou-se isso através da correlação forte positiva entre as médias de volume tumoral e o tempo de desenvolvimento (Figura 2; Tabela 7). A análise qualitativa das características macroscópicas e volume tumoral expôs a disparidade

de comportamento de crescimento tumoral, conforme a concentração celular e momento. Houve correlação positiva entre ulceração e tipo de formação, volume tumoral e coloração. Todos os casos com ulceração foram associados a massa de coloração negra. Tais características vão ao encontro das relatadas para melanoma oral melânico em cães, com crescimento acelerado, lesões ulceradas e hemorrágicas (SMITH, 2005; BERGMAN, 2012). Constatou-se correlação positiva para volume tumoral e coloração, sendo que as formações em massa eram em totalidade negras. Tal informação suporta a possibilidade de comparação com melanoma melânico em cães, e é justificável pela forte pigmentação escura presente nas formações tumorais a partir de B16F10 (FIDLER; NICOLSON, 1976)

Outro aspecto comum ao que pode ser diagnosticado em cães foi o crescimento inicial radial, observado no Grupo 2 (REQUICHA et al., 2012) e demonstrado na comparação das médias dos volumes tumorais *versus* tempo de desenvolvimento (Figura 2).

O Grupo 1 apresentou intensa pigmentação, com as manifestações em sua maioria negras. Já as do Grupo 2 variaram de avermelhadas, marrons escuras a negras, em conformidade com o crescimento tumoral. As margens tumorais foram em maioria irregulares para ambas as estratégias de indução, com a presença de regularidade no Grupo 2 para as duas semanas iniciais. As características de coloração, regularidade e tipo de formação ocorreram em consonância com o descrito na literatura para doença em cães (GIOSO, 2005; REQUICHA et al., 2012; POORMAN et al., 2014).

O Grupo 1 de indução de Melanoma Oral Murino teve agressividade superior quando comparado ao proposto por Fidler (1973) para melanoma cutâneo, com óbito decorrente da progressão anterior a sete dias em um animal, e dois óbitos antes dos quatorze dias. Para delineação de modelo pré-clínico de melanoma oral em camundongos, é válido considerar alguns aspectos já citados para modelos de melanoma, como a interação das células neoplásicas com o microambiente tumoral, a fim de que expressem sua habilidade proliferativa, de migração e invasão. A permanência de tumor primário por um período conhecido é outro aspecto fundamental do modelo, que possibilita relacionar a progressão tumoral com o agente terapêutico utilizado (SANTIAGO-WALKER et al, 2009). Os achados

sugerem que a progressão tumoral foi mais evidente no Grupo 1, com tumores mensuráveis, porém óbitos precedentes a sete e quatorze dias, o que limitaria sua aplicabilidade para testes terapêuticos. A menor concentração celular (Grupo 2) não propiciou tumores mensuráveis para sete e quatorze dias de desenvolvimento, e quando os tumores eram aferíveis (21º dia), a progressão tumoral acarretou em óbitos precedentes a eutanásia.

A possibilidade de ampla ressecção da formação tumoral do melanoma oral murino permite análise histopatológica mais abrangente do acometimento *in situ* ou radial em comparação com a realizada em cães, com ressecção muitas vezes incompleta devido à localização anatômica (SIMPSON et al., 2013).

Em relação a análise histopatológica comparativa, nota-se invasão em tecidos adjacentes, o que remete macroscopicamente ao crescimento vertical. As células tiveram aspecto misto partilhado por cães e camundongos, como também houve presença de células alongadas e arredondas em feixes. O núcleo evidente foi característica comum. Tanto a capacidade de angiogênese (PEREIRA et al., 2008), quanto a presença de áreas necróticas (SPANGLER; KASS, 2006) observadas em ambas as espécies, denotam o crescimento vertical rápido.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho desenvolveu melanoma oral em camundongos, a fim de utilizá-lo como modelo de estudo para o melanoma oral canino.

As análises quantitativas para volumes tumorais, e qualitativa para características macroscópicas e volume tumoral demonstraram que houve disparidade de comportamento de crescimento tumoral, conforme a concentração celular e momento. O desenvolvimento e progressão tumoral foram elucidados pelas correlações positivas entre volume tumoral e ulceração, coloração e ulceração, tipo de formação e ulceração. As características de coloração, regularidade e tipo de formação, bem como as histopatológicas ocorreram em consonância com o descrito na literatura para doença em cães.

A progressão tumoral foi superior no Grupo 1, com indução tumoral a partir de 5×10^4 células de B14F10, evidenciada pela presença de tumores mensuráveis, porém com óbitos sete e quatorze dias, o que limitaria sua aplicabilidade para testes terapêuticos. No Grupo 2, com indução tumoral através de 1×10^4 células de B16F10, a menor concentração celular não propiciou tumores mensuráveis para sete e quatorze dias de desenvolvimento, e quando os tumores eram aferíveis (21º dia), a progressão tumoral acarretou em óbitos precedentes a eutanásia.

O melanoma oral murino como modelo de estudo pré-clínico para cães se mostrou uma alternativa útil, viável e reproduzível. Observamos que houve correlação positiva entre o número de células da linhagem B16F10 e volume tumoral, traduzidas em desenvolvimento e progressão tumoral.

A expansão do número de cães que apresentam melanoma oral tem se tornado um desafio para prática veterinária. O modelo aqui proposto para o estudo deste tipo de tumor será de grande valia para que alternativas aos tratamentos atuais possam surgir com maior frequência e eficiência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKTIPIIS C. A., et al. Cancer across the tree of life: cooperation and cheating in multicellularity. **Phil. Trans. R. Soc. B** 370: 20140219, 2015.
- BERGIN I.L., et al., Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. **Veterinary Pathology**. 48: 41–53, 2011.
- BERGMAN, P.J.; CAMPS-PALAU, M.A.; MCKNIGHT, J. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. **Vaccine**. 24:4582- 4585, 2006.
- BERGMAN, P. J. Canine oral melanoma. **Clinical Techniques in Small Practice**, v. 22.: 55- 60, 2007.
- BERGMAN, J.P. Melanoma Review. **Updated September**, 2012.
- BREEN, M. Update on genomics in veterinary oncology. **Top Companion Animal Med**. 24(3):113–121, 2009.
- CAMARGO, L. P.; CONCEIÇÃO, L. G.; COSTA, P. R. S. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, 45(2):138-152, 2008.
- CHEN, J; SPROUFFSKE, K; HUANG, Q; MALEY, C. C. Solving the Puzzle of Metastasis: The Evolution of Cell Migration in Neoplasms. **PLoS ONE**. 6(4): e17933, 2011.
- CHOISUNIRACHON, N. et al. Effects o flow-dose cyclophosphamide with piroxicam on tumour neovascularization in a canine oral malignant melanoma-xenografted mouse model. **Veterinary and Comparative Oncology**. 13(4):424-32, 2013.
- CHON, E. et al. Activation of the Canonical Wnt/ β -Catenin Signalling Pathway is Rare in Canine Malignant Melanoma Tissue and Cell Lines. **J Comp Pathol**. 148: 178–187, 2013.
- ELLERHORST J.A.; DIWAN A.H.; DANG S.M. Promotion of melanoma growth by the metabolic hormone leptin. **Oncol Rep**. 23:901–907, 2010.
- ELLIS, A. E. et al. Gingival osteogenic melanoma in two dog. **J Vet Diagn Invest** 22:147–151, 2010.
- EKMEKCIOGLU, S; ELLERHORST J.A.; PRIETO V.G. Tumor iNOS predicts poor survival for stage III melanoma patients. **Int J Cancer**. 15;119(4):861-6, 2006.
- FEARON K.C., GLASS D.J., GUTTRIDGE D.C. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. **Cell Metab**. 16: 153–166, 2012.
- FERGUSON W.S., GOORIN A.M. Current treatment of osteosarcoma. **Cancer Invest**. 19:292– 315, 2001.
- FIDLER I.J. Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. **Nature**. 242: 148-149, 1973.

FIDLER I.J.; NICOLSON G.L. Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. **J Natl Cancer Inst** 57:1199–202, 1976.

FOSSUM, T. W. Cirurgia de Pequenos Animais. **Elsevier Brasil**, ed. 3, 2008.

GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res**. 27: 90–102. 2013.

GIOSO, M.A. Neoplasias de la cavidad oral. II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Odontología, Cirugía Maxilofacial Veterinarias y Experimental (Livro de Resumos), Madrid, Espanha, 2005.

GREAVES, M.; MALEY, C.C. Clonal evolution in cancer. **Nature**. 481(7381): 306– 313, 2012.

GREENE, V.R. et al. Expression of Leptin and iNOS in Oral Melanomas in Dogs. **J Vet Intern Med**. 27(5): 1278– 1282, 2013.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S. M.; LI, L.; HERLYN, M.. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell Research**. 18: 150 – 159, 2005.

HAN, J.I.; KIM, D. Y.; NA, K. J. Alteration in E-Cadherin/b-Catenin Expression in Canine Melanotic Tumors. **Vet. Pat**. 50(2): 274-280, 2012.

HERLYN, M., KALABIS, M. What Is a Good Model for Melanoma?. **Journal of Investigative Dermatology** 130: 911–912, 2010.

HSU, M.K.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem**. 29:577-580, 1981.

IUSSICH, S.; MANISCALCO, L; SCIUVA, A DI; IOTTI, B. PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2016. doi: 10.1111/vco.12190.

OYAMADA, T., et al. Pathology of Canine Oral Malignant Melanoma with Cartilage and/or Osteoid Formation. **Oncology Letters**. J Vet Med Sci. 69(11):1155-61, 2007.

MACEWEN, E.G. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. **Cancer Metastasis Rev**. 9: 125–136, 1990.

MORRISON, W.B. Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management. **Baltimore: Williams & Wilkins**, 1998.

NOVAK E. M, et al. Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. **Gene Ther**.10:1992-1997, 2003.

OTTNOD J. M. et al. A retrospective analysis of the efficacy of Oncept vaccine for the adjunct treatment of canine oral malignant melanoma. **Vet Comp Oncol**. 11(3):219- 29, 2013.

PATTEN, S.G. et al. VEGFR2 heterogeneity and response to anti-angiogenic low-dose metronomic cyclophosphamide treatment. **BMC Cancer**; 10: 683, 2010.

PEREIRA, J. et al. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 30(3):223-228, 2008.

PRZEZDZIECKI R., CZOPOWICZ M., SAPIERZYNSK R. Accuracy of routine cytology and immunocytochemistry in preoperative diagnosis of oral amelanotic melanomas in dogs. **Vet Pathol**. 597-604, 2015.

POORMAN, K. et al. Comparative cytogenetic characterization of primary canine melanocytic lesions using array CGH and fluorescence in situ hybridization. **Chromosome Res** 23:1, 2015.

POSER, I. et al. Loss of E-cadherin Expression in Melanoma Cells Involves Up-regulation of the Transcriptional Repressor Snail. **The Journal of Biological Chemistry**. 276: 24661-24666, 2001.

PROULX, D. R. et al. A retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. **Vet Radiol Ultrasound**. 44(3): 352-359, 2003.

RAMOS-VARA J.A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Vet Pathol**. 37:597-608, 2000.

REQUICHA, J.F. et al. Canine oral cavity neoplasias - Brief review. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 37(1):41-46, 2015.

ROLIM, V.M. et al. Amelanotic melanoma in dogs: A retrospective study of 35 cases (2004-2010) and immunohistochemical characterization. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 32(4):340-346, 2012.

SANTIAGO-WALKER, A.; LI, L.; HAASS, N.K.; HERLYN, M. Melanocytes: From morphology to application. **Skin Pharmacol. Physiol**. 22, 114-121, 2009.

SEO, K. et al. Antitumor effects of celecoxib in COX-2 expressing and nonexpressing canine melanoma cell lines. **Res Vet Sci**. 96(3): 482-486, 2014.

SILVA, M.S.B. et al. Tratamento de melanoma oral em um cão com criocirurgia. **Acta Sci. Vet.**, 34:211-213, 2006.

SIMPSON, R.M. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. 27(1):37-47, 2013.

SMITH, M.M.; Oral and salivary gland disorders. Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 2(6): 1290-1296, 2005.

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. A comparative review of Melanocytic Neoplasms. **Vet Pathol**. 39(6):651-78, 2002.

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

SOUZA, T. M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Cienc. Rural**. 36 (2): 555-560, 2006.

TAKEBE, N.; IVY, S.P. Controversies in cancer stem cells: Targeting embryonic signaling pathways. **Clin Cancer Res**. 16(12): 3106–3112, 2010.

TOMINAGA, M. et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood and tumor-infiltrating regulatory T cells in dogs with oral malignant melanoma. **J Vet Diagn Invest**. 22: 438–441, 2010.

TREGGIARI, E.; GRANT, J. P.; NORTH, S. M. A retrospective review of outcome and survival following surgery and adjuvant xenogeneic DNA vaccination in 32 dogs with oral malignant melanoma. **J. Vet. Med. Sci**. 78(5): 845–850, 2016.

VILLAMIL, J.A.; HENRY, C.J.; BRYAN, J.N. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasm. **J Am Vet Med Assoc**. 239(7):960–965, 2011.

XIE, T. et al. Comprehensive Characterization of Genome-Wide Copy Number Aberrations in Colorectal Cancer Reveals Novel Oncogenes and Patterns of Alterations. **PLoS ONE**. 7(7): e42001, 2012.

WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. Small Animal Clinical Oncology. Veterinary and Comparative Oncology, 3rd ed. 305-317. 2013; 11, 3, 219–229, 2013.

8 ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 023/2015**

Protocolo UEPG – 8398/2015

Título – Uso de animais de descarte. – (Projeto de pesquisa Desenvolvimento e avaliação comparativa de melanoma em cavidade oral em camundongos frente ao canino)**Data de Entrada** – 18/06/2015**Resultado:** Aprovado ***Data/Prazo** – 02/07/2015 a 01/07/2017**Considerações**

Prezado Professor Dr. Giovani Marino Favero:

Em relação à utilização de animais no projeto de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 5 (cinco) animais.

APROVADO.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROF. CGA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Prof. Dr. Carlos Roberto Lodi
PresidenteAv. Gen. Carlos Cavalcanti, n.º 4748, CEP 84.030-900 Campos Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP

UEPG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL****CARTA DE APROVAÇÃO**

Processo CEUA – 004/2016

Protocolo UEPG – 674/2016

Título - "Desenvolvimento e avaliação comparativa de melanoma oral em camundongos, frente a sua ocorrência espontânea em cães"

Data de Entrada – 11/02/2016

Resultado: Aprovado

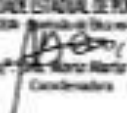
Data/Prazo – 7/03/2016 a 7/03/2018

ConsideraçõesPrezado Professor Dr. *Giovani Marino Favero*:

Em relação à utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de 15 (quinze) camundongos isogênicos, C57BL/6, de 60 dias de idade, com aproximadamente 30 gramas.

Ponta Grossa, 07 de março de 2016

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-RETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

 Prof. Dr. Maria Maria Lodi
 Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvarias
 Ponta Grossa - Paraná
 Bloco de Reitoria - Anexo à PROPE/PP
 Fone: (042) 3225-5264