

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA
DETECÇÃO DE MICROMETÁSTASE EM LINFONODO DE
CÃES COM MELANOMA ORAL**

Isabela Fani Davanso Zapolla

Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP CÂMPUS DE
JABOTICABAL**

**UTILIZAÇÃO DA IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA
DETECÇÃO DE MICROMETÁSTASE EM LINFONODO DE
CÃES COM MELANOMA ORAL**

Discente: Isabela Fani Davanso Zapolla

Orientador(a): Prof. Dr(a). Andriago Barboza de Nardi

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre
em Ciências Veterinárias

Z35u

Zapolla, Isabela Fani Davanso

Utilização da imuno-histoquímica para detecção de micrometástase em linfonodo de cães com melanoma oral / Isabela Fani Davanso Zapolla. -- Jaboticabal, 2025

35 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andrigo Barboza de Nardi

1. Gânglios linfáticos. 2. Imuno-histoquímica. 3. Metástase. 4. Melanoma oral. 5. Tumores de cabeça e pescoço. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE MICROMETÁSTASE EM LINFONODO DE CÃES COM MELANOMA ORAL

AUTORA: ISABELA FANI DAVANSO ZAPOLLA

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Veterinárias, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**
Data: 01/12/2025 22:04:46-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **THIAGO DEMARCHI MUNHOZ**
Data: 06/11/2025 16:11:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. THIAGO DEMARCHI MUNHOZ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP

Documento assinado digitalmente
 **IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO**
Data: 06/11/2025 17:31:43-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Ass. Dr. IGOR LUIZ SALARDANI SENHORELLO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMVA UNESP Araçatuba

Jaboticabal, 06 de novembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Isabela Fani Davanso Zapolla – Nascida em 02 de novembro de 1993, em Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Graduada em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Moura Lacerda (2017). Durante a graduação, atuou como monitora das disciplinas de Parasitologia em Cães e Gatos e Patologia Animal. Realizou estágios extracurriculares em Clínica Médica de Pequenos Animais no Hospital Veterinário do Centro Universitário Moura Lacerda (2014–2017) e no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais da UNESP Jaboticabal (2016). O estágio curricular obrigatório foi integralmente desenvolvido na área de Clínica Médica de Pequenos Animais, com parte na UNESP Jaboticabal e parte na Universidade de Franca (UNIFRAN).

Concluiu residência multidisciplinar em Pequenos Animais no Hospital Veterinário da Universidade Brasil, campus Descalvado (2018–2020), e pós-graduação em Oncologia Veterinária de Cães e Gatos pelo Instituto Bioethicus, Botucatu (2021–2023). Possui cursos profissionalizantes em Eletroquimioterapia (2023) e Cuidados Paliativos (2025). Atualmente, é mestranda do Programa de Ciências Veterinárias em Clínica Médica, com ênfase em Oncologia Veterinária, na UNESP Jaboticabal (2023–2025).

EPÍGRAFE

***“Mas o tempo passa no tempo dele, indiferente à torcida para apressar
ou retardar sua velocidade” – Ana Claudia Quintana Arantes***

DEDICATÓRIA

Acredito em uma força maior que ilumina meus passos todos os dias, e sei que se cheguei até aqui é porque nunca caminhei sozinha.

À minha mãe, Rosângela, meu guia eterno, que mesmo não estando presente fisicamente, vive em mim e em meu coração. Ao meu pai, Luiz Henrique, que sempre acreditou nos meus sonhos e nunca mediu esforços para me ajudar a realizá-los.

Ao meu noivo, Lucas, meu porto seguro, que esteve ao meu lado em todos os momentos — cuidando de mim, me erguendo nas quedas e celebrando comigo cada conquista.

Ao meu pai científico, Paulo, por quem tenho imensa admiração. Obrigada por estar sempre presente, me guiando com paciência, compartilhando conhecimento e me proporcionando tanto aprendizado. Ao meu segundo pai científico, Andrigo, que me recebeu de braços abertos, me deu novas oportunidades de crescimento e me ensinou, com muita paciência, a caminhar junto de grandes profissionais. Sinto-me honrada por poder aprender e evoluir ao lado de ambos.

Aos meus amigos-irmãos, minha segunda família, que tornam a caminhada mais leve e feliz, Adilson, Lipe, Victória, Marília, meus colegas de trabalho da BMvet, que por muito tempo vem sendo minha segunda casa.

E, com todo meu coração, a cada paciente que passou pela minha vida. Cada olhar, cada lambida e cada gesto de carinho marcaram minha história, aqueceram minha alma e me ensinaram que viver é muito mais do que simplesmente estar vivo. A força e a dignidade de cada um deles me lembram diariamente como a vida é linda, mesmo quando o desfecho não é o que gostaríamos.

Desde criança, sonhei em ser médica veterinária. Hoje, viver esse sonho é a maior realização da minha vida. A pequena Isabela, que um dia sonhou com tudo isso, está orgulhosa da mulher que se tornou e de cada passo dado até aqui. Que ela siga aprendendo sempre e, acima de tudo, continue ajudando e honrando aqueles que dão sentido à sua vocação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	-
LISTA DE FIGURAS.....	-
LISTA DE ABREVIACÕES.....	-
1. CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS.....	7
CAPÍTULO 2 – UTILIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECÇÃO DE MICROMETÁSTASE EM LINFONODO DE CÃES COM MELANOMA ORAL.....	9
1. OBJETIVOS.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3. RESULTADOS.....	11
4. DISCUSSÃO.....	14
REFERÊNCIAS	20
CONCLUSÃO GERAL.....	21

RESUMO

O estadiamento clínico é um dos fatores prognósticos mais importantes em melanoma oral canino. Ele é baseado no tamanho tumoral, presença de metástase linfonodal e a distância. Animais com envolvimento linfático normalmente apresentam sobrevidas consideravelmente menores do que cães sem metástases linfonodais. Apesar das macrometástases serem facilmente diagnosticadas, as micrometástases podem ser desafiadoras e necessitarem de complementação diagnóstica, com técnica de imuno-histoquímica. Dessa forma o presente estudo tem como objetivo comparar a acurácia da histopatologia com a imuno-histoquímica na detecção de metástase em linfonodo, que será de grande valia no estadiamento clínico de cães com melanoma oral e possibilitará definir se há diferenças entre metástase macroscópica e microscópica, a fim de futuramente estes dados serem utilizados na tentativa de reformulação do estadiamento clínico. Foram utilizadas amostras provenientes do Laboratório VETPAT– Campinas de 50 cães com diagnóstico de melanoma oral melânico sem metástase na avaliação histopatológica em linfonodos regionais para processamento de imuno-histoquímica com marcadores Melan-A e SOX-10 para avaliação da possibilidade de micrometástases. Seis de cinquenta pacientes (12%) apresentaram marcação positiva para Melan-A e SOX-10, indicando a presença de metástase linfonodal microscópica. O padrão de apresentação das micrometástases foi variável, desde pequenos agrupados e cordões celulares em padrão organoide, em foco único na porção cortical ou pericapsular do linfonodo, até agregados maiores distribuídos em múltiplos pontos. Todos os focos metastáticos identificados estavam localizados nas regiões periféricas (corticais/pericapsulares) dos linfonodos. Com os dados obtidos neste estudo, ficou evidente que a imuno-histoquímica oferece uma visão mais precisa e complementar, contribuindo para um planejamento terapêutico mais adequado. A utilização dessa técnica no estadiamento do melanoma oral em cães se apresenta como uma ferramenta que agrega maior valor ao diagnóstico e proporciona uma abordagem mais eficaz e direcionada no tratamento dos pacientes afetados por essa doença.

Palavras-Chave:Gânglios linfáticos; Imuno-histoquímica; Metástase; Melanoma oral; Tumores de cabeça e pescoço.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Clone, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para a marcação imuno-histoquímica de SOX-10 e Melan-A em linfonodos de cães portadores de melanoma oral.....11

Tabela 2 - Resumo das características demográficas dos cães incluídos no estudo e dos parâmetros clínicos e histopatológicos dos melanomas orais melânicos avaliados, incluindo idade, raça, sexo, localização do tumor primário, tamanho do nódulo, atipia nuclear, índice mitótico e presença de metástase em linfonodos regionais.....12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de linfonodo canino com metástase de Melanoma. Observar pequeno grupo de células positivas para SOX10, padrão nuclear.....13

Figura 2: Fotomicrografia de linfonodo canino com metástase de Melanoma. Observar agrupado de células com citoplasma marcado para Melan A.....14

LISTA DE ABREVIACÕES

IHQ- Imunohistoquímica

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1. REVISÃO DE LITERATURA

A ocorrência de neoplasias na espécie canina tem crescido nos últimos anos devido a maiores expectativas de vida desses animais, estimando-se que 1 em cada 10 cães irão desenvolver algum tipo de tumor durante a vida. (Withrow & Vail, 2007; Meuten 2017)

A cavidade oral representa um dos locais mais comuns de desenvolvimento de neoplasias em cães, correspondendo a aproximadamente 5–7% de todos os tumores diagnosticados na espécie (Polton et al., 2024). O melanoma oral é considerado a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral em cães, originando-se dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina (Polton et al., 2024).

Seu comportamento biológico é variável, em sua grande maioria altamente agressivo, sendo influenciado por fatores como localização tumoral, tamanho, estadiamento clínico e características histopatológicas, incluindo índice mitótico, grau de pigmentação celular, atipia nuclear e presença de invasão óssea (Polton et al., 2024). De modo geral, os melanomas orais apresentam crescimento rápido, comportamento localmente invasivo e elevada taxa de metástase, principalmente para linfonodos regionais e pulmões, além de apresentarem alta taxa de recorrência local após tratamento cirúrgico (Proulx et al., 2003; Polton et al., 2024). A avaliação precisa do comprometimento linfonodal é fundamental para o estadiamento adequado e definição do prognóstico em cães com melanoma oral. Estudos recentes demonstram que a presença de metástase em linfonodos regionais está associada à pior sobrevida e maior risco de disseminação metastática, reforçando a importância da avaliação criteriosa desses linfonodos durante o estadiamento da doença (Mayer & Sukut, 2025).

O estadiamento da doença demonstrou estar significativamente associado à evolução clínica e de sobrevida para cães com melanoma oral. (Polton et al., 2024) O estadiamento I tem nódulo menores de 2 cm de diâmetro, estadiamento II têm nódulos

com diâmetro de 2 a 4 cm, estadiamento III tem com nódulos maiores de 4 cm de diâmetro e/ou evidência de metástase em linfonodo. e cães em estadiamento IV tem evidência de metástase à distância. (BERGMAN P.J., 2007; Polton et al., 2024).

Segundo Proulx et al. (2003), tempo médio de sobrevida para cães com melanoma oral tratados cirurgicamente é aproximadamente 17 a 18 meses para os casos em estágio I, 5-6 meses para estágio II e 3 meses para estágio III.

A avaliação precisa do comprometimento linfonodal é fundamental para o adequado estadiamento e prognóstico da doença, sendo atualmente considerada parte essencial do manejo clínico dos tumores orais em cães (Mayer & Sukut, 2025; Polton et al., 2024). A importância do estadiamento linfonodal em neoplasias foi amplamente demonstrada em estudos da medicina humana, especialmente em tumores de cavidade oral, nos quais o grau de envolvimento linfonodal mostrou-se um importante indicador prognóstico. A presença de metástase em linfonodos regionais está associada a maior taxa de recorrência tumoral e à diminuição da sobrevida dos pacientes. Além disso, pode ter valor preditivo na determinação de metástase à distância, sendo observada uma incidência aproximadamente duas vezes maior de disseminação metastática em pacientes com envolvimento linfonodal em comparação àqueles sem esse acometimento. (Woolgar, 1999)

O diagnóstico preciso é fundamental para definir o prognóstico e a melhor abordagem terapêutica dos melanomas orais. Para isso, utilizam-se exames como citologia, histopatologia e imunohistoquímica (IHC). No entanto, o diagnóstico definitivo pode ser desafiador devido à variabilidade no pleomorfismo celular e pigmentação, já que essas neoplasias podem se assemelhar a outros tipos tumorais, como carcinomas, sarcomas e neoplasias de células redondas, que diferem em prognóstico e tratamento. (Ramos-Vara et al., 2000)

A citologia por aspiração com agulha fina (PAAF) é uma ferramenta útil, rápida e acessível para triagem diagnóstica, mas pode apresentar resultados inconclusivos, exigindo exames complementares. Em estudo conduzido por Gross et al. (2005) que, em 46,9% dos casos avaliados, o diagnóstico foi alterado após revisão histopatológica, destacando a alta variabilidade entre observadores e a limitação da citologia isolada.

O exame histopatológico é o método de referência para definir o padrão morfológico, além da identificação de fatores prognósticos como atipia nuclear, índice mitótico, grau de pigmentação, infiltração e invasão vascular. (Meuten, 2017) No entanto, sua precisão pode ser limitada em melanomas pouco pigmentados ou com morfologia indefinida. Como o melanoma pode se apresentar em três formas (epiteloide, fusiforme e de células redondas), pode ser confundido com outros tumores. Nesses casos, é necessário o uso da IHQ para confirmação do diagnóstico, especialmente nos melanomas amelanóticos. (Ramos-Vara et al., 2000; Gillard et al., 2014).

Em relação a avaliação dos linfonodos, há debate na literatura quanto ao método mais adequado para essa análise. Estudos sugerem que o exame histopatológico convencional, baseado em cortes representativos únicos, pode não detectar micrometástases ocultas, resultando em falsos negativos com incidência variando entre 2,2% e 7,9%. (Mullins et al., 2004). Nesse contexto, a IHQ surge como uma técnica complementar de grande valor, capaz de identificar células neoplásicas por meio de marcadores específicos, mesmo em linfonodos considerados livres de metástase pela histologia tradicional. A identificação de micrometástases pode modificar significativamente o estadiamento do paciente, impactar nas decisões terapêuticas e, conseqüentemente, alterar sua expectativa de vida. (Mullins et al., 2004; Hsu et al., 2013).

Entre os marcadores imuno-histoquímicos utilizados na identificação de tumores melanocíticos, o Melan-A destaca-se como um dos mais amplamente empregados na rotina diagnóstica. Esse marcador reconhece um antígeno associado à diferenciação melanocítica e apresenta elevada especificidade para células da linhagem melanocítica, sendo útil na confirmação do diagnóstico de melanomas, especialmente nos casos pouco pigmentados ou amelanóticos. Em cães, o Melan-A demonstra elevada sensibilidade na detecção de melanomas cutâneos e mucosos, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com outros marcadores imuno-histoquímicos (Ramos-Vara et al., 2002; Meuten, 2017).

Devido às limitações de sensibilidade observadas em alguns casos, recomenda-se frequentemente a utilização de painéis imuno-histoquímicos combinados, incluindo marcadores como Melan-A, PNL2, HMB-45 e tirosinase,

aumentando assim a precisão diagnóstica na identificação de melanomas, particularmente nos tumores amelanóticos ou com morfologia atípica (Ramos-Vara et al., 2002; Polton et al., 2024).

A utilização da IHC com uma combinação de Melan-A, PNL2, TRP-1 e TRP-2 como anticorpos únicos, ou como um coquetel, fornece alta sensibilidade e especificidade para detectar melanomas amelanóticos. A utilização do marcador imuno-histoquímico Cocktel Melanoma atualmente é o mais utilizado devido ao fato de ser o mais sensível na detecção dos casos positivos. Composto por três marcadores: o Melan-A, HMB45 e a Tirosinase, Ramos-Vara et al. (2002) em seu trabalho, demonstrou que dos 49 casos de melanoma amelanótico, 46 foram positivos para Cocktel Melanoma, com 100% de especificidade e 93,9% de sensibilidade em sua identificação.

Smith et al., (2002) também mostraram limitações de sensibilidade e/ou especificidade em marcadores clássicos (S-100, PNL2, Melan A, TRP-1, TRP-2 e HMB-45).

O SOX-10, um fator de transcrição envolvido na diferenciação melanocítica, na crista neural periférica e no sistema nervoso, tem sido avaliado como marcador imunohistoquímico em tumores humanos (melanoma, carcinoma de mama, glioma, schwannoma) e, mais recentemente, em espécies veterinárias. (Nonaka et al., 2009)

Em um estudo com 198 tumores, o SOX-10 marcou $\geq 75\%$ das células em 91,5% dos melanomas, demonstrando excelente desempenho diagnóstico. Embora também seja expresso em algumas neoplasias não melanocíticas, como carcinomas mamários e gliomas, sua especificidade em tumores orais não melanocíticos foi de 92,7%, ou seja, não marcou falsamente tumores orais de outra origem. Assim, o SOX-10 configura-se como um marcador promissor na triagem IHQ de melanomas orais em cães, com potencial diagnóstico relevante, ainda que estudos adicionais sejam necessários para avaliar seu uso em outros tipos tumorais. (Nonaka et al., 2009; Moll et al., 2020).

Nonaka et al. (2009) relataram 100% de positividade nuclear para SOX-10 em metástases de melanoma humano em linfonodos, sem marcação em células pigmentadas não tumorais. Esses achados foram corroborados por Moll et al. (2020), que recomendam o SOX-10 como marcador de escolha para avaliação de linfonodos

sentinela, devido à sua elevada reprodutibilidade diagnóstica e concordância interobservador.

Embora ainda pouco explorado na medicina veterinária, os dados disponíveis indicam que o SOX-10 pode ter desempenho superior a marcadores mais antigos, especialmente em melanomas caninos com morfologia atípica ou amelanótica (Meuten, 2017).

Portanto, o uso do SOX-10 como marcador complementar à histopatologia e à imunocoloração convencional representa um avanço no diagnóstico do melanoma oral, permitindo maior precisão na detecção de micrometástases, estadiamento mais acurado, e, conseqüentemente, uma abordagem terapêutica mais eficaz.

Além do estadiamento clínico, diversos fatores histopatológicos têm sido associados ao prognóstico do melanoma oral em cães. Entre os principais parâmetros avaliados destacam-se o grau de atipia celular, o índice mitótico, o padrão de crescimento tumoral, o grau de pigmentação e a presença de invasão vascular ou óssea (Meuten, 2017; Polton et al., 2024). O índice mitótico, determinado pela contagem de figuras de mitose em campos de grande aumento, tem sido consistentemente associado ao comportamento biológico da neoplasia, sendo que valores mais elevados indicam maior atividade proliferativa e pior prognóstico. Da mesma forma, graus mais acentuados de atipia nuclear refletem maior agressividade tumoral e estão frequentemente associados a maior potencial metastático.

Entre os marcadores imuno-histoquímicos utilizados para avaliação da atividade proliferativa tumoral, o Ki-67 tem sido amplamente estudado em melanomas caninos. Esse marcador nuclear está presente em células em fase ativa do ciclo celular e sua expressão está diretamente relacionada à taxa de proliferação tumoral. Estudos demonstram que índices elevados de Ki-67 estão associados a menor tempo de sobrevida e maior risco de progressão da doença em cães com melanoma oral (Bergman, 2007; Meuten, 2017). Dessa forma, a avaliação conjunta dos parâmetros histopatológicos tradicionais e de marcadores proliferativos pode fornecer informações prognósticas adicionais relevantes para o manejo clínico desses pacientes.

O tratamento do melanoma oral envolve o controle local da doença, incluindo a remoção cirúrgica com margens amplas considerada a principal abordagem terapêutica. Essa pode ser associada a modalidades adjuvantes, como radioterapia ou eletroquimioterapia. O controle regional inclui a avaliação e, quando indicado, a remoção dos linfonodos mandibulares e retrofaríngeos. No âmbito sistêmico, a quimioterapia apresenta eficácia limitada, enquanto abordagens imunoterápicas têm demonstrado resultados promissores (Bergman, 2007; Polton et al., 2024).

REFERÊNCIAS

- BERGMAN, P. J. **Canine oral melanoma**. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 22, n. 2, p. 55-60, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2007.03.004>
- GILLARD, M. et al. **Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas**. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2014.
- GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. *Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis*. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2005.
- GROSS, TL. et al. **Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis**. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.
- HSU, F. S.; KITCHELL, B. E.; VALLI, V. E. et al. **Prognostic value of sentinel lymph node biopsy in canine oral malignant melanoma**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 11, n. 1, p. 40-49, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00303.x>
- MAYER, M. N.; SUKUT, S. 2025. *Regional lymph nodes in canine oral tumors: diagnostic and prognostic importance*. *Canadian Veterinary Journal*, 66(5):571–574.
- MAYER, M. N.; SUKUT, S. 2025. **Regional lymph nodes in canine oral tumors: diagnostic and prognostic importance**. *Canadian Veterinary Journal*, 66(5):571–574.
- MEUTEN, D. J. (Ed.). *Tumors in domestic animals*. 5. ed. Ames: Wiley Blackwell, 2017.
- MOLL, R.; DÄRR, R.; KUHLMANN, T. et al. **Sox-10 expression in human tumors: a diagnostic marker for melanocytic tumors and peripheral nerve sheath tumors**. *Histopathology*, v. 77, n. 3, p. 447-458, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.14132>
- MULLINS, M. N.; RODRIGUEZ, C. O.; HAWKINS, D. S. et al. **Cytologic evaluation of lymph nodes for metastasis in canine oral malignant melanoma**. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 5, p. 362-369, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.41-5-362>
- NONAKA, D.; CHIRIBOGA, L.; SOSLOW, R. A. **Expression of Sox-10 in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues**. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 32, n. 5, p. 645-655, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31815c003d>
- POLTON, G. et al. 2024. *Consensus recommendations for the diagnosis and management of canine oral melanoma*. *Frontiers in Veterinary Science*. doi:10.3389/fvets.2024.1359426.
- POLTON, G. et al. 2024. **Consensus recommendations for the diagnosis and management of canine oral melanoma**. *Frontiers in Veterinary Science*. doi:10.3389/fvets.2024.1359426.
- PROULX, D. R.; OGILVIE, G. K.; WITHROW, S. J. et al. **A retrospective analysis of 70 cases of canine oral malignant melanoma (1987–1997)**. *Journal of Veterinary*

Internal Medicine, v. 17, n. 4, p. 557-562, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02485.x>

RAMOS-VARA, J. A.; BEISKE, K.; MILLER, M. A. **Diagnostic utility of Melanoma Cocktail immunohistochemical stain in canine melanomas.** *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 4, p. 456-463, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.39-4-456>

RAMOS-VARA, J. A.; MILLER, M. A.; JOHNSON, G. C. et al. **Melanoma marker expression in canine oral and cutaneous melanomas.** *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 6, p. 597-607, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.37-6-597>

SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; MCMANUS, P. M. **A comparative review of melanocytic neoplasms.** *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.39-6-651>

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (Eds.). *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007.

WOOLGAR, J. A. **Pathology of the N0 neck.** *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 37, n. 3, p. 205-209, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1054/bjom.1999.0137>

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença de micrometástases linfonodais em cães com melanoma oral por meio da utilização da imunohistoquímica com marcadores Melan-A e SOX-10, caracterizando o padrão e a distribuição dessas lesões nos linfonodos. Busca-se, ainda, demonstrar o valor desta técnica como ferramenta complementar ao diagnóstico histopatológico, contribuindo para um estadiamento mais preciso da doença e para o planejamento de estratégias terapêuticas mais direcionadas e eficazes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo utilizando amostras arquivadas no banco de dados do laboratório VETPAT – Campinas. Foram analisados casos de cães diagnosticados com melanoma oral melânico, submetidos à avaliação histopatológica entre janeiro de 2022 e junho de 2023.

Inicialmente, foram selecionados 54 blocos de parafina contendo linfonodos regionais provenientes desses pacientes. A maioria das amostras correspondia a linfonodos mandibulares ipsilaterais à lesão primária, considerados os principais linfonodos de drenagem da cavidade oral em cães. Após avaliação da qualidade do material histológico, quatro amostras foram excluídas por apresentarem artefatos técnicos ou quantidade insuficiente de tecido, impossibilitando a realização adequada da análise imuno-histoquímica. Dessa forma, foram incluídos no estudo 50 blocos de parafina contendo linfonodos sem evidência de metástase na avaliação histopatológica convencional.

Apesar do período de coleta abranger mais de um ano, o número de amostras elegíveis foi limitado principalmente pela ausência de envio de linfonodos regionais juntamente com as peças cirúrgicas em diversos casos de melanoma oral. Em muitos procedimentos cirúrgicos mais extensos, como mandibulectomias e maxilectomias,

frequentemente apenas o tumor primário era encaminhado para análise histopatológica, sem avaliação concomitante dos linfonodos regionais.

Para a realização do exame de imuno-histoquímica, os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 5 µm, montados em lâminas de vidro previamente identificadas e submetidos à desparafinização em xilol a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução álcool/xilol, também a 60 °C, por mais 30 minutos.

A reidratação foi realizada por meio de dois banhos consecutivos em álcool absoluto (5 minutos cada), seguidos de banhos em álcool 95% e 70%, finalizando com imersão em solução tampão PBS por 5 minutos.

A recuperação antigênica foi conduzida em solução de ácido cítrico (10 mM, pH 6,0), utilizando o sistema de calor úmido Pascal® por 8,5 minutos. Posteriormente, foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6%.

As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários Melan-A e SOX-10 (Tabela 1) durante a noite, em câmara úmida a 4 °C. Na sequência, procedeu-se à incubação com o polímero conjugado EnVision Plus® a 37 °C por 30 minutos. A reação foi revelada com solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina de Harris. Controles internos e/ou externos foram utilizados para validação das reações imuno-histoquímicas.

A avaliação das lâminas foi realizada por microscopia óptica convencional, utilizando microscópio de luz em aumentos de 100× e 400×. A presença de células isoladas ou agrupamentos celulares imunomarcados para Melan-A ou SOX-10 no parênquima linfonodal foi considerada indicativa de micrometástase.

O clone, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Clone, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para a marcação imuno-histoquímica de SOX-10 e Melan-A em linfonodos de cães portadores de melanoma oral.

Anticorpo	Clone	Marca	Diluição
SOX-10	G-11	Santa Cruz	1:300
Melan-A	A 103	Agilent Dako	1:400

A identificação de grupos de células nos linfonodos marcadas para Melan A e SOX10 foi considerada como “positiva” para pesquisa de micrometástase.

RESULTADOS

Os dados de 50 cães diagnosticados com melanoma oral, incluindo informações sobre o status dos linfonodos, registrados entre janeiro de 2022 e junho de 2023 no laboratório VETPAT -Campinas, estão resumidos na Tabela 2.

A idade média no momento do diagnóstico foi de 12 anos. Entre as raças mais afetadas, 21 cães (39,6%) eram mestiços, representando o maior número de casos, seguidos pelos Poodles (11,3%) e pelos Rottweilers (7,5%). A distribuição dos pacientes conforme o sexo revelou uma discreta predominância do sexo feminino, com 29 fêmeas (58%) e 21 machos (42%). Quanto às informações obtidas nos laudos, 41 pacientes forneceram dados sobre a localização do tumor, com 22 casos (53,6%) localizados na mandíbula, seguidos por gengiva (21,95%) e maxila (12,2%).

Em relação ao tamanho dos nódulos, observou-se que 11 casos (22%) apresentavam lesões com diâmetro inferior a 2 cm, enquanto a maioria (n=27; 54%) encontrava-se na faixa intermediária de 2 a 4 cm, e 9 casos (18%) apresentaram nódulos com diâmetro superior a 4 cm.

No que tange à avaliação morfológica dos melanomas melânicos, a atipia nuclear foi observada em 68% dos casos. Dentre esses, apenas três apresentaram percentual de atipia inferior a 30%, enquanto os demais demonstraram valores superiores, indicando maior grau de pleomorfismo celular. Alterações nucleares, incluindo anisocariose, hipercromasia e irregularidade nuclear, são frequentemente descritas como indicadores de comportamento biológico mais agressivo em melanomas orais caninos (Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011).

Em relação ao índice mitótico, todos os casos avaliados (100%) apresentaram mais de quatro figuras mitóticas por campo de grande aumento (400×), com média de 11 figuras mitóticas por campo. Valores superiores a quatro mitoses por campo de grande aumento têm sido associados a pior prognóstico e maior agressividade tumoral em melanomas orais de cães (Bergin et al., 2011).

Tabela 2 - Resumo das características demográficas dos cães incluídos no estudo e dos parâmetros clínicos e histopatológicos dos melanomas orais melânicos avaliados, incluindo idade, raça, sexo, localização do tumor primário, tamanho do nódulo, atipia nuclear, índice mitótico e presença de metástase em linfonodos regionais.

VARIÁVEL	RESUMO
Idade média	12 anos
Raça	Mestiço 42%, Poodle 11%, Rottweiler 8%, Outras 39%
Sexo	Macho 42%, Fêmea 58%
Localização do tumor (n=41)	Mandíbula 54%, Gengiva 22%, Maxila 12%, Outras 12%
Tamanho do nódulo	<2 cm 22%, 2–4 cm 54%, >4 cm 18%
Atipia nuclear	Presente 68%, Ausente 32%
Índice mitótico	>4/10 hpf* 100% (média = 11)
Metástase em linfonodos	Positivo 12%, Negativo 88%

* High Power Field (Campo de Grande Aumento)

Entre as amostras testadas, seis (12%) dos 50 linfonodos avaliados, apresentaram de forma simultânea, marcação positiva para Melan-A e SOX-10, revelando a presença de metástase microscópica.

O padrão de apresentação das micrometástase foi variável, desde pequenos agrupados e cordões celulares, em padrão organoide, em foco único na porção cortical/pericapsular do linfonodo (figura 1) até agregados maiores distribuídos em mais de um ponto no linfonodo (figura 2).

Todos os focos metastáticos identificados se localizavam em porções periféricas (corticais/pericapsulares) dos linfonodos.

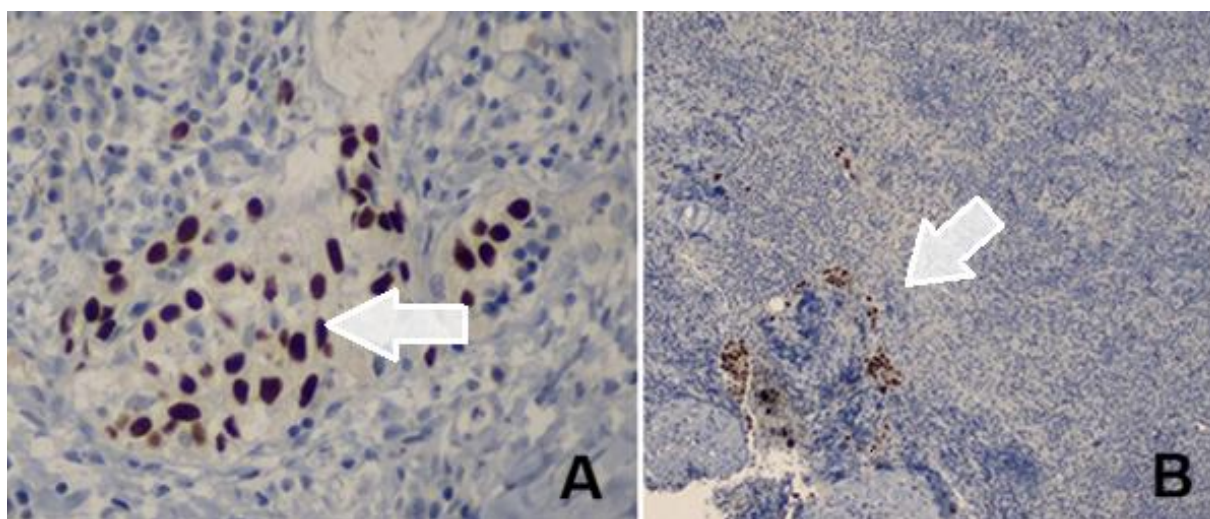


Figura 1: Fotomicrografias de linfonodo de cão com micrometástase de melanoma oral melânico identificada por imuno-histoquímica para SOX-10. (A) Agrupamento de células neoplásicas exibindo imunomarcção nuclear positiva para SOX-10. (B) Visão panorâmica do linfonodo demonstrando foco metastático composto por células imunorreativas. Imuno-histoquímica com cromógeno DAB e contracoloração por hematoxilina. Aumento: A = 400 $\times$; B = 100 $\times$.

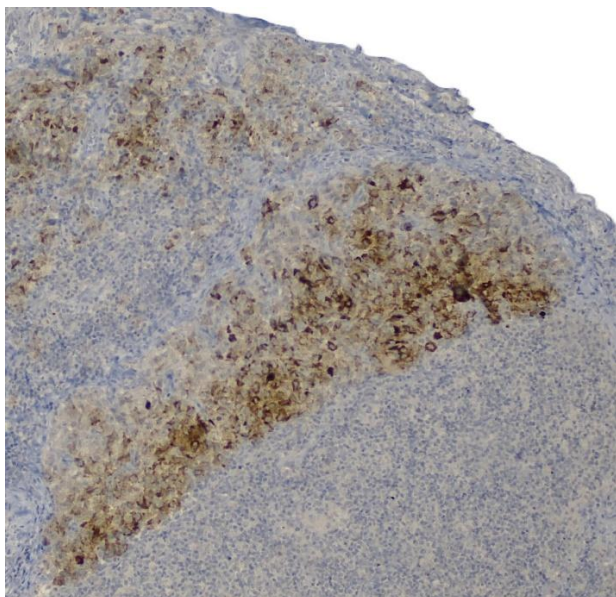


Figura 2: Fotomicrografia de linfonodo de cão com metástase de melanoma oral melânico evidenciada por imuno-histoquímica para Melan-A. Observa-se agrupamento de células neoplásicas apresentando imunomarcagem citoplasmática positiva para Melan-A. Imuno-histoquímica com cromógeno DAB e contracoloração por hematoxilina. Aumento: 100×.

DISCUSSÃO

Os cães incluídos neste estudo apresentaram idade média de 12 anos, achado compatível com a literatura, que descreve maior ocorrência de melanoma oral em animais idosos. Estudos prévios relatam idade média entre 10 e 13 anos em cães acometidos por essa neoplasia, reforçando o caráter predominantemente geriátrico da doença (Bergman, 2007; Spangler & Kass, 2006).

Em relação à localização tumoral, observou-se maior frequência de lesões mandibulares, seguida de gengivais e maxilares, padrão semelhante ao descrito em séries retrospectivas de melanoma oral canino, nas quais a cavidade oral caudal e a região mandibular são frequentemente reportadas como locais de maior incidência.

Quanto ao tamanho das lesões, a maioria dos tumores apresentou diâmetro entre 2 e 4 cm, faixa frequentemente associada a estágios intermediários da doença. O tamanho tumoral é reconhecido como importante fator prognóstico no melanoma oral canino, estando associado a maior risco de invasão local e disseminação metastática em tumores maiores (Bergman, 2007).

A presença de metástases em linfonodos de pacientes com diagnóstico de melanoma oral afeta diretamente tanto o estadiamento quanto o prognóstico da doença. Em cães, Ramos-Vara et al. (2000) demonstraram que a ocorrência de metástases em linfonodos está associada a uma redução significativa na sobrevida dos pacientes, destacando a importância de estratégias diagnósticas que aumentem a sensibilidade na detecção dessas alterações.

No presente estudo, todos os linfonodos foram considerados livres de metástases pela histopatologia convencional, porém a utilização da imunohistoquímica (IHQ) permitiu a identificação de micrometástases em 12% das amostras analisadas, confirmando a capacidade desta técnica em revelar acometimentos neoplásicos não detectados pela análise morfológica tradicional. Esses achados ressaltam o risco de subestadiamento quando se confia exclusivamente na coloração por hematoxilina e eosina (HE), sobretudo em lesões de baixo volume ou distribuição periférica (Fan et al., 2024).

Embora o número de casos com micrometástases identificadas neste estudo tenha sido limitado, é plausível considerar uma possível associação entre a presença dessas lesões e características histopatológicas indicativas de maior agressividade tumoral, como maior índice mitótico e presença de atipia nuclear. Estudos prévios demonstram que melanomas orais com maior atividade proliferativa apresentam maior probabilidade de disseminação metastática para linfonodos regionais (Spangler & Kass, 2006; Bergin et al., 2011).

Dessa forma, a detecção de micrometástases por imuno-histoquímica pode representar um indicador adicional de comportamento biológico agressivo, contribuindo para um estadiamento mais preciso da doença.

Adicionalmente, observou-se que os focos metastáticos apresentavam morfologia variável — de pequenos agrupamentos celulares com padrão organoide a agregados multifocais — mas estavam consistentemente localizados em áreas corticais ou pericapsulares dos linfonodos. Essa distribuição periférica reforça a limitação do plano de corte padrão na histopatologia e justifica o uso de cortes seriados e marcadores imunohistoquímicos para aumentar a representatividade diagnóstica (Hsu et al., 2013; Zhou et al., 2020).

A aplicação combinada dos marcadores Melan A e SOX-10 mostrou-se eficaz na identificação das micrometástases. O Melan A, conhecido por sua alta especificidade para melanócitos, apresentou excelente desempenho, corroborando os dados de Ramos-Vara et al. (2000), que relataram positividade em 92% dos melanomas orais caninos. Já o SOX-10, marcador nuclear, demonstrou coloração nítida e limpa, mesmo em áreas com intensa pigmentação, o que facilitou a interpretação e evitou reações inespecíficas, especialmente com melanófagos.

Esses achados estão em consonância com Nonaka et al. (2009), que observaram 100% de positividade nuclear para SOX-10 em linfonodos humanos com metástase de melanoma. De forma semelhante, Moll et al. (2020), ao avaliarem 401 linfonodos metastáticos humanos, relataram que o SOX-10 apresentou desempenho semelhante ao pS100, com alta reprodutibilidade entre patologistas, sendo recomendado como padrão para avaliação de linfonodo sentinela.

Na medicina veterinária, Ramos-Vara et al. (2006) destacaram a importância da IHQ na detecção de micrometástases em tumores mamários caninos, encontrando acometimento em 9,2% dos linfonodos negativos pela HE, o que permitiu o reestadiamento clínico em 12,5% das pacientes. Kim et al. (2007) também evidenciaram que a IHQ com AE1/AE3 em "touch imprints" aumentou significativamente a sensibilidade da citologia, com valor preditivo negativo superior ao da coloração convencional.

Os dados do presente estudo também se alinham a evidências robustas da oncologia humana. Em neoplasias de cavidade oral, particularmente carcinoma espinocelular, Hsu et al. (2013) observaram que a IHQ com AE1/AE3 detectou micrometástases em 50% dos linfonodos inicialmente negativos, enquanto a histologia convencional identificava apenas 27%. Revisões sistemáticas, como a realizada por Fan et al. (2024), indicam que aproximadamente 20% dos pacientes com câncer oral ou orofaríngeo apresentam metástases ocultas à histologia, com repercussões diretas no prognóstico e na conduta terapêutica.

Além disso, Zhou et al. (2020) demonstraram que, em casos de câncer gástrico, o uso de cortes seriados e IHQ elevou a taxa de detecção de micrometástases para 45%, com reestadiamento em 23,5% dos pacientes. Em câncer colorretal, Nagtegaal et al. (2002) relataram que AE1/AE3 foi capaz de detectar

metástases não identificadas pela HE em linfonodos regionais, destacando a sensibilidade superior da técnica. Já Maeshima et al. (2015), ao avaliarem carcinoma de pulmão (NSCLC), revelaram metástases ocultas em até 48% dos linfonodos inicialmente negativos, com impacto direto no estadiamento e no plano terapêutico.

Portanto, a utilização da imunoistoquímica como ferramenta auxiliar na detecção de metástases linfonodais em cães com melanoma oral, como demonstrado neste estudo, é tecnicamente viável, sensível e altamente recomendável. A técnica permite a identificação de focos tumorais mínimos, melhora a acurácia do estadiamento, orienta a conduta clínica de forma mais precisa e se alinha a práticas diagnósticas já consolidadas na medicina humana. A adoção dessa abordagem na oncologia veterinária tem o potencial de contribuir para o desenvolvimento de uma medicina mais personalizada e baseada em evidências, com impacto positivo direto na sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

Entre as limitações deste estudo, destaca-se o número relativamente reduzido de casos avaliados, o que pode limitar a generalização dos achados e a estimativa da real frequência de micrometástases linfonodais em cães com melanoma oral. Além disso, a ausência de acompanhamento clínico dos pacientes impossibilitou a correlação direta entre a presença de micrometástases detectadas por imuno-histoquímica e desfechos clínicos relevantes, como tempo de sobrevida ou ocorrência de recidiva.

O caráter retrospectivo da amostragem também limitou a padronização das informações clínicas disponíveis, bem como a identificação precisa de todos os linfonodos regionais analisados. Adicionalmente, o delineamento do estudo incluiu exclusivamente linfonodos previamente classificados como negativos pela histopatologia convencional, o que impossibilitou a determinação da sensibilidade diagnóstica da histopatologia em comparação direta com a imuno-histoquímica.

Por fim, a utilização de apenas dois marcadores imuno-histoquímicos (Melan-A e SOX-10), embora amplamente reconhecidos na identificação de células melanocíticas, pode não contemplar todos os subtipos de melanoma, particularmente aqueles com expressão antigênica atípica.

Perspectivas futuras

Os achados deste estudo evidenciam a relevância da imunoistoquímica como método complementar na detecção de micrometástases linfonodais em cães com melanoma oral, apontando seu potencial impacto no estadiamento e nas decisões terapêuticas. Estudos futuros, com amostras mais amplas e seguimento clínico dos pacientes, poderão validar esses resultados e possibilitar a correlação entre a presença de micrometástases e o prognóstico, sobretudo em termos de tempo de sobrevida e resposta ao tratamento. Além disso, a consolidação da imunoistoquímica na rotina diagnóstica poderá contribuir para a padronização de protocolos de estadiamento linfonodal, promovendo uma abordagem mais precisa, individualizada e baseada em evidências, com potencial para reformulação dos critérios clínicos atualmente utilizados na oncologia veterinária.

Aprovação ética e consentimento para participação

Não se aplica. Este estudo utilizou amostras de tecidos incluídos em parafina, provenientes de um banco de dados de um laboratório veterinário de diagnóstico. Nenhum procedimento experimental ou manipulação animal foi realizado.

Consentimento para publicação

Não se aplica.

Disponibilidade dos dados e materiais

Os conjuntos de dados utilizados e analisados durante o presente estudo estão disponíveis com o autor correspondente mediante solicitação.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Financiamento

Esta pesquisa não recebeu financiamento específico de nenhuma agência de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Contribuições dos autores

Isabela F.D. Zapolla: concepção, metodologia, seleção das amostras, análise dos dados, redação do manuscrito.

Andrigo B. Nardi: supervisão, metodologia, revisão do manuscrito.

Felipe Sueiro: seleção das amostras, interpretação dos dados, análise laboratorial, revisão histopatológica.

Paulo César Jark: supervisão, metodologia, revisão do manuscrito.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Diagnóstico Veterinário VETPAT–Campinas pelo acesso ao banco de dados de amostras.

REFERÊNCIAS

- BERGIN, I. L. et al. **Prognostic evaluation of Ki67 expression in canine oral melanoma**. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 41–53, 2011.
- BERGMAN, P. J. **Canine oral melanoma**. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. (eds.). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 402–407.
- FAN, X. et al. **Detection of micrometastases in oral and oropharyngeal cancers: a systematic review**. *Oral Oncology*, v. 146, p. 106705, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2023.106705>
- HSU, F. S. et al. **Prognostic value of sentinel lymph node biopsy in canine oral malignant melanoma**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v. 11, n. 1, p. 40-49, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2011.00303.x>
- KIM, J. H. et al. **Usefulness of immunohistochemistry for the detection of micrometastases in canine mammary tumors**. *Journal of Veterinary Science*, v. 8, n. 1, p. 79-85, 2007. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.1.79>
- MAESHIMA, A. M. et al. **Prognostic impact of micrometastases detected by immunohistochemistry in lymph nodes from non-small cell lung cancer patients**. *Modern Pathology*, v. 28, n. 5, p. 670-678, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2014.138>
- MOLL, R. et al. **Sox-10 expression in human tumors: diagnostic value in melanocytic tumors and nerve sheath tumors**. *Histopathology*, v. 77, n. 3, p. 447-458, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.14132>
- NAGTEGAAL, I. D. et al. **Detection of micrometastases in colorectal cancer lymph nodes by immunohistochemistry**. *Journal of Pathology*, v. 198, n. 3, p. 237-243, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.1192>
- NONAKA, D.; CHIRIBOGA, L.; SOSLOW, R. A. **Expression of SOX-10 in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues**. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 33, n. 6, p. 823-829, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31819f9d4c>
- RAMOS-VARA, J. A. et al. **Detection of micrometastases in canine mammary tumors by immunohistochemistry**. *Veterinary Pathology*, v. 43, n. 3, p. 241-250, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.43-3-241>
- RAMOS-VARA, J. A. et al. **Melanoma marker expression in canine oral and cutaneous melanomas**. *Veterinary Pathology*, v. 37, n. 6, p. 597-607, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.37-6-597>
- SPANGLER, W. L.; KASS, P. H. **The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia**. *Veterinary Pathology*, v. 43, n. 2, p. 136–149, 2006.
- ZHOU, Y. et al. **Detection of lymph node micrometastases in gastric carcinoma using serial sectioning and immunohistochemistry**. *World Journal of Gastroenterology*, v. 26, n. 12, p. 1344-1354, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i12.1344>

CONCLUSÃO GERAL

O melanoma oral é uma neoplasia altamente agressiva em cães, frequentemente associada à disseminação metastática para linfonodos regionais. Os resultados deste estudo demonstram que a utilização da imuno-histoquímica, por meio dos marcadores Melan-A e SOX-10, representa uma ferramenta eficaz para a detecção de micrometástases linfonodais não identificadas pela histopatologia convencional. A aplicação dessa técnica pode contribuir para o aprimoramento do estadiamento tumoral, possibilitando uma avaliação mais precisa da disseminação da doença e auxiliando na tomada de decisões terapêuticas. Dessa forma, a incorporação da imuno-histoquímica na avaliação de linfonodos regionais pode representar um avanço relevante no manejo diagnóstico e prognóstico de cães com melanoma oral.