

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação prognóstica das amplificações somáticas focais dos
cromossomos 10 e 30 no melanoma oral canino e sua
correlação histopatológica e clínica**

MARINA VALSECCHI HENRIQUES

Botucatu – SP
Abril 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**Avaliação prognóstica das amplificações somáticas focais dos
cromossomos 10 e 30 no melanoma oral canino e sua
correlação histopatológica e clínica**

MARINA VALSECCHI HENRIQUES

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biotecnologia
Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista como
pré-requisito para obtenção do título de
Mestre

Orientador: Dr. Carlos Eduardo
Fonseca Alves
Coorientador: Dra. Renee Laufer
Amorim

Botucatu – SP

Abril 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Henriques, Marina Valsecchi.

Avaliação prognóstica das amplificações somáticas focais dos cromossomos 10 e 30 no melanoma oral canino e sua correlação histopatológica e clínica / Marina Valsecchi Henriques. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Carlos Eduardo Fonseca Alves

Coorientador: Renee Laufer Amorim

Capes: 50500007

1. Cães - Doenças. 2. Câncer Prognóstico. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Melanoma. 5. Tumores.

Palavras-chave: CFA10; CFA30; PCR quantitativo.

Nome do autor (a): Marina Valsecchi Henriques

Título: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DAS AMPLIFICAÇÕES SOMÁTICAS FOCAIS DOS CROMOSSOMOS 10 E 30 NO MELANOMA ORAL CANINO E SUA CORRELAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E CLÍNICA

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dra. Priscila Emiko Kobayashi

Membro

Departamento de Clínica Veterinária - FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

Membro

Departamento: Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – São Paulo /SP

Data da Defesa: 28 de abril de 2023.

Dedico a Leonardo, Ângela e Guto.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente a minha família, meu companheiro Leonardo, minha mãe Ângela, meu irmão Guto e todos os meus amores, vocês me dão a força necessária mesmo quando longe, saibam que muitas vezes gostaria de estar mais presente, o amor de vocês me faz ser uma pessoa melhor todos os dias.

Em segundo lugar agradeço ao meu brilhante orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves que topou me guiar nesse caminho mesmo sabendo das limitações de trabalho/estudo e sempre foi extremamente gentil e disponível, que todos possam encontrar pessoas assim em suas caminhadas.

Aos integrantes do nosso grupo de pesquisa do Setor de Patologia Animal do Hospital Veterinário da UNESP Botucatu - SP, que são igualmente gentis e dedicados, principalmente a Guilherme, Zara, Alessandra, Patrícia, Antônio e Alexandre por todos os ensinamentos e parcerias estabelecidas ao longo desse período.

Além disso, agradeço aos meus amigos de toda uma vida Gabriel, Marina e Raquel, vocês são a família que escolhi e que sei que posso contar para todo o sempre.

Por fim, agradeço aos meus guias e orixás, pois aprendi que a fé pode ser uma força tão importante quanto a coragem.

*“O amor é uma combinação de cuidado, compromisso, conhecimento,
responsabilidade, respeito e confiança.”.*

bell hooks

SUMÁRIO

Capítulo 1

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA -----	1
2- REVISÃO DE LITERATURA -----	2
2.1- Melanoma Oral Canino -----	2
2.2- Sinais clínicos e diagnóstico -----	5
2.3- Fatores prognósticos -----	6
2.4- Tratamento e prognóstico -----	10
2.5- CFA 10 -----	12
2.6- CFA 30 -----	12
2.7- PCR quantitativo -----	14
3- REFERÊNCIAS -----	16
HIPÓTESE -----	24
OBJETIVOS -----	24

Capítulo 2

1- INTRODUÇÃO -----	27
2- MATERIAIS E MÉTODOS -----	28
2.1- Amostras de melanoma oral canino e levantamento de dados clínicos -----	28
2.2- Exame histopatológico -----	29
2.3- Extração do DNA genômico -----	29
2.4- PCR quantitativo -----	30
2.5- Análise estatística -----	32
3- RESULTADOS -----	32
4- DISCUSSÃO -----	39
5- CONCLUSÃO -----	42
6- REFERÊNCIAS -----	42

LISTAS DE FIGURAS

1- FIGURA 1 Arquivo pessoal – melanoma oral canino em região caudal de mandíbula -----	4
2- FIGURA 2 Arquivo pessoal – metástase de melanoma oral canino em linfonodo mandibular -----	4
3- FIGURA 3 Figura de mitose e grau de pigmentação -----	8
4- FIGURA 4 PCR Quantitativo -----	16
5- FIGURA 5 Amplificações satisfatórias das amostras de melanoma oral canino e da amostra controle de tecido normal -----	31
6- FIGURA 6a Sequenciamento da região do gene TRPM7 do CFA30 ----	31
7- FIGURA 6b Sequenciamento da região do gene TRPM7 do CFA30 ---	31
8- FIGURA 7 Curvas de fusão das amostras de melanoma oral canino em comparação com a amostra controle para CFA 30 -----	36
9- FIGURA 8 Amostras controle de tecido normal de cão representadas em verde e amostras de melanoma oral representadas em vermelho (amostras 38 e 1) para CFA 10 região do gene MDM2 -----	37
10- FIGURA 9 Amostras controle entre 81°C e 82°C e as amostras de melanoma oral entre 82°C e 83°C para CFA 10 região do gene CDK4 -	38

LISTAS DE TABELAS

- 1- Tabela 1** Dados clínicos das amostras de melanoma oral canino ----- 33
- 2- Tabela 2** Avaliação histopatológica das amostras de melanoma oral
canino (índice mitótico e grau de pigmentação) e Sobrevida Global -- 38

RESUMO

O melanoma oral canino é a principal neoplasia maligna da cavidade oral em cães e é considerada uma doença muito agressiva. A taxa metastática é de cerca de 80% e pode se disseminar para linfonodos regionais, pulmões e outros órgãos. Estudos recentes demonstraram que alterações na expressão gênica do melanoma humano e canino compartilham ativação e sensibilidade à inibição de vias de sinalização relacionadas ao câncer. O ganho e/ou perda no número de cópias pode alterar o nível de expressão de oncogenes e adquirir vantagens tumorais conferidas por essas amplificações focais causando um rearranjo cromossômico estrutural. O objetivo deste estudo foi avaliar amplificações focais no cromossomo 10 e 30 (*Canis familiaris* 10 e 30) de melanoma oral canino utilizando PCR quantitativo e correlacioná-las com aspectos clínicos e patológicos. Foram analisados 45 tumores e como resultado não houve amplificação focal para o CFA 30 nas amostras avaliadas. Para o gene MDM2 do CFA 10 apenas duas amostras apresentaram amplificação e no gene CDK4 todas as amostras apresentaram amplificação. Como não pode ser definido um padrão entre as amplificações encontradas e os fatores prognósticos analisados, não foi identificada relevância na rotina clínica para estes marcadores.

Palavras-chave: tumores melanocíticos, PCR quantitativo, CFA10, CFA30.

ABSTRACT

Canine oral melanoma is the main malignant neoplasm of the oral cavity in dogs, and it is considered very aggressive disease. The metastatic rate is round 80% and can spread to regional lymph nodes, lungs and other organs. Recent studies demonstrated that alterations in human and canine melanoma gene expression share activation and sensitivity to inhibition of cancer-related signaling pathways, the gain and/or loss in copy number can alter the level of expression of oncogenes and acquire tumor advantages conferred by these focal amplifications causing a structural chromosomal rearrangement. The aim of this study was to evaluate focal amplifications on chromosomes 10 and 30 (*Canis Familiaris* 10 and 30) using quantitative PCR of canine oral melanoma and correlate them with clinical and pathological aspects. 45 tumors were analyzed and as a result there was no focal amplification for the CFA 30 in the evaluated samples, for the MDM2 gene of the CFA 10 only two samples presented amplification and in the CDK4 gene all samples presented amplification, as a pattern between the samples cannot be defined. amplifications found and the prognostic factors analyzed, no relevance was identified in the clinical routine for these markers.

Keywords: melanocytic tumors, quantitative PCR, CFA10, CFA30.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O melanoma é um câncer com origem em melanócitos, sendo relativamente comum nos cães, e abrange 3% de todas as neoplasias que acometem esta espécie (VON EULER et al., 2008, BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). É responsável pela maior porcentagem de neoplasias malignas da cavidade oral (56%) e pode acometer outros locais como lábios (23%), pele (11%) e dígitos (8%) (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). O melanoma oral canino é considerado agressivo com taxa de metástase acima de 80%, podendo se disseminar para linfonodos regionais e outros órgãos, principalmente pulmões (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020).

O tratamento do melanoma oral canino consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, como terapias únicas ou multimodais e podem ser usadas para controle local e sistêmico da neoplasia (FREEMAN et al., 2003, BORJA et al., 2004, BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). Novas terapias também estão sendo estudadas, como eletroquimioterapia para controle local da doença (SPUGNINI, et al., 2007, SPUGNINI & BALDI, 2019) e imunoterapia no tratamento sistêmico (MELLMAN et al., 2011, ALMELA & ANSÓN, 2019). O índice mitótico tem valor prognóstico em termos de probabilidade de sobrevivência, neoplasias com figuras de mitose acima de 4 mitoses em 10 campos de 400x tem pior prognóstico. Melanomas amelanóticos foram associados a um índice mitótico maior, em comparação com neoplasias com pigmentos melânicos no citoplasma. Na análise imuno-histoquímica, o aumento da expressão do Ki-67 está correlacionado com propensão metastática moderada a alta (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020).

Alterações genéticas somáticas são importantes para determinarmos o comportamento biológico das neoplasias, como também encontrar alvos terapêuticos possíveis que auxiliem no tratamento (HENDRICKS et al., 2018, WONG et al., 2019). Na genética do melanoma oral canino, o cromossomo canino, *Canis Familiaris* (CFA) é caracterizado por diversos ganhos ou perdas em regiões cromossômicas, com essa análise determinam-se as alterações no número de cópias (HENDRICKS et al., 2018, WONG et al., 2019). Em estudo recente, amplificações focais de CFA 30 foram frequentemente encontradas no melanoma oral canino e estão associadas a um resultado ruim e a outros fatores prognósticos como um alto índice mitótico e fenótipo amelanótico (POORMAN et al., 2015, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019, PROUTEAU et al., 2020). A taxa de sobrevida média observada para cães com amplificações em CFA 30 foi de 159 dias, contra 317 dias de cães sem amplificações (PROUTEAU et al., 2020).

Outro cromossomo que frequentemente foi associado a mudanças estruturais no genoma de melanomas orais caninos foi o CFA 10, apresentando ganho no número de cópias seguido de perda e associado a oncogenes que também apresentaram relevância no melanoma de mucosa humano (POORMAN et al., 2015, BROCCA, et al., 2019, ZAMBONI, et al., 2020, PROUTEAU, et al., 2022).

Assim, o presente estudo pretende avaliar as amplificações somáticas focais nos cromossomos 10 e 30 do melanoma oral canino e correlacionar com fatores prognósticos e clínico patológicos, fazendo a análise histopatológica das amostras de melanomas orais, levantamento dos dados clínicos e correlação com as mutações encontradas nos cromossomos 10 e 30 por meio de PCR em tempo real.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Melanoma Oral Canino

Melanomas originam-se de melanócitos que são células dendríticas com origem embrionária no neuroectoderma e que se deslocam para derme, epiderme, mucosas e olhos na embriogênese (SMITH et al., 2002, NISHIYA et al., 2016).

O melanoma canino pode acometer locais como lábios, pele, cavidade oral e dígitos, sendo os dois últimos com comportamento biológico mais agressivo (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). Gengiva e mucosa labial são os locais mais comuns de melanoma em cavidade oral (RAMOS-VARA et al., 2000).

A etiologia do melanoma oral canino ainda não é bem conhecida, sabe-se que provavelmente não há envolvimento de exposição à radiação solar como acontece no melanoma cutâneo. Prováveis causas como traumas, microbiota da cavidade oral, exposição à produtos químicos e inflamação podem culminar para a carcinogênese (NISHIYA et al., 2016).

Cães com mucosa altamente pigmentada tem maior risco de desenvolver melanoma oral, as raças mais citadas pelos recentes estudos são Cocker Spaniel, Poodle, Chow Chow, Golden Retriever, mistura de raças com Pequinês e Poodle, Labrador, Rottweiler e Yorkshire. (RAMOS-VARA et al., 2000, DOBSON, 2013, GILLARD et al., 2014, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019). Acomete animais idosos, com média de idade entre 10-11 anos e não tem predisposição sexual (PROUTEAU & ANDRÉ, 2019).

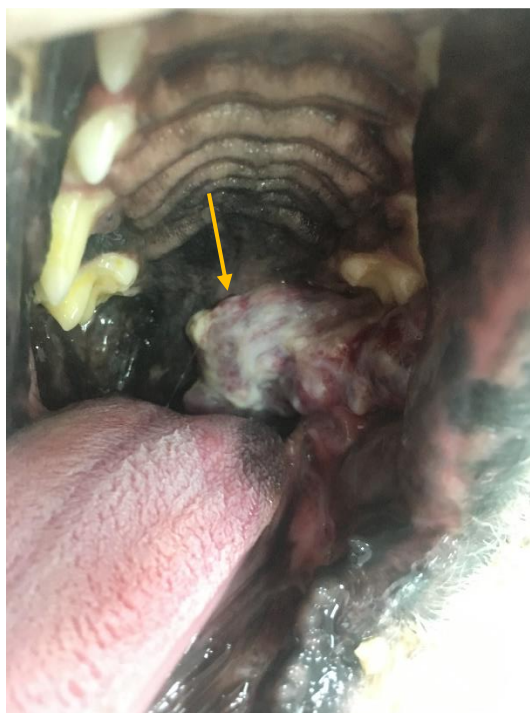


FIGURA 1: Arquivo pessoal – melanoma oral canino em região caudal de mandíbula.



FIGURA 2: Arquivo pessoal – metástase de melanoma oral canino em linfonodo mandibular.

2.2 Sinais clínicos e diagnóstico

Os melanomas podem se caracterizar como massas pequenas ou grandes, pigmentadas ou amelanicas, planas ou verrucosas, com ou sem ulceração, localizadas mais comumente em gengiva e lábios, mas podem acometer palato, tonsilas, língua e faringe (RAMOS-VARA et al., 2000, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019, PALMA et al., 2021). Os principais sinais clínicos são disfagia, sialorreia, halitose, sangramento e por vezes fraturas devido à invasão óssea tumoral (SMITH et al., 2002, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019).

A taxa de metástase em melanomas orais é acima de 80%, podendo se disseminar para linfonodos regionais e outros órgãos, principalmente pulmões. Cerca de 40% dos linfonodos em tamanho normal podem apresentar metástase no exame citopatológico ou histopatológico, porém com baixa taxa de sensibilidade da citologia para linfonodos metastáticos em cães, entre 63% e 78% (WILLIAMS & PACKER, 2003, FOURNIER et al., 2018, BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020, PALMA et al., 2021).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) os estágios clínicos definidos para o melanoma oral canino definem como estágio I neoplasias menores que 2 cm sem metástase em linfonodo, estágio II incluem neoplasias entre 2 e 4 cm sem envolvimento de linfonodos, neoplasias acima de 4 cm com ou sem envolvimento de linfonodos são caracterizados como estágio III e por fim, neoplasias de qualquer tamanho, porém com metástase distante são classificadas como estágio IV (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). As taxas de sobrevida variam com o estágio clínico, pacientes em estágio I podem ter sobrevida de até 19 meses, já pacientes em estágio II tem taxa de sobrevida relatada em até 6 meses (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020).

A hipótese de metástase paralela é pensada para tumores como o melanoma oral canino, a ideia de que diferentes subpopulações de células do tumor primário são responsáveis pela disseminação metastática e que muitas vezes acontece em paralelo a disseminação regional para cadeia linfática e a disseminação à distância (SANBORN et al., 2015, PALMA et al., 2021). Um novo estudo mostrou que camundongos com melanoma possuíam metástases pulmonares que se originaram tanto de linfonodos quanto do tumor primário (PEREIRA, et al., 2018, PALMA et al., 2021). O que reforça a necessidade de a avaliação do paciente com melanoma oral incluir exames complementares de imagem, além dos sanguíneos e patológicos.

O diagnóstico de melanomas orais é feito principalmente através do exame histopatológico por biópsia incisional, a citologia aspirativa pode até ser realizada, porém comumente não é satisfatória devido ao alto grau de inflamação e necrose presentes nesses tumores (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020).

Os melanomas podem ser divididos quanto ao tipo celular, dependendo da forma da célula, são do tipo epitelióides com células redondas e poligonais, fusiformes parecidos com fibroblastos e mistos que podem apresentar ambos os tipos celulares (NISHIYA et al., 2016). O tipo histológico aparentemente não tem correlação com o prognóstico da doença (FONSECA-ALVES et al., 2021).

A imuno-histoquímica pode ajudar a diferenciar de carcinomas e sarcomas os melanomas amelanóticos, que compõem 1/3 dos melanomas caninos (NISHIYA et al., 2016, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019). Podem ser usados como marcadores moleculares, pois são proteínas presentes em muitos

melanomas: MELAN-A, PNL-2, HMB45, TRP-1 e TRP-2 (FONSECA-ALVES et al., 2021).

Na imuno-histoquímica para determinar a origem melanocítica de um tumor é realizado um painel de anticorpos contra PNL2, Melan-A, TRP-1 e TRP-2 (SMEDLEY et al., 2011, HARDWICK, 2021), SOX-10 é um marcador usado para diagnosticar neoplasias melanocíticas em humanos, um estudo recente na veterinária avaliou a imunomarcção em melanomas orais fusiformes amelanóticos e sarcomas de tecidos moles orais, 20 melanomas e 20 sarcomas, todos os 20 melanomas orais e 2 dos 20 sarcomas foram marcados para SOX-10, resultando em 100% de sensibilidade e 90% de especificidade para este anticorpo (TSOI et al., 2021, SMEDLEY et al., 2022).

2.3 Fatores prognósticos

As alterações histopatológicas encontradas que ajudam como marcadores prognósticos no melanoma oral são principalmente o índice mitótico, atipia nuclear, grau de pigmentação e o nível de invasão/infiltração (SMEDLEY et al., 2011, FONSECA-ALVES et al., 2021).

Em células pouco diferenciadas a atipia celular será vista por nucléolos maiores e irregulares, muitas vezes múltiplos, podem ter aparência vacuolizada grosseira e situados à margem. Um estudo definiu uma escala de 1 a 10 representando a estimativa de porcentagem de atipia nuclear em 200 células contadas (0= sem atipia, 1= 1-19% de núcleos envolvidos, 2= 10-19% de núcleos envolvidos, 3= 20-29% e assim por diante, até completar a pontuação de 10) (SPANGLER & KASS, 2006), para melanomas orais caninos foi então classificado um limite de ≥ 4 ($\geq 30\%$) para um prognóstico desfavorável (BERGIN et al., 2011, SMEDLEY et al., 2011).

O índice mitótico de melanomas orais caninos é de ≥ 4 figuras de mitose em contagem de 10 campos em objetiva de 40x. Pacientes com alto índice mitótico demonstram pior prognóstico, ≥ 4 figuras possuem risco de morte em até 1 ano de diagnóstico (SMEDLEY et al., 2011, SMEDLEY, et al., 2022).

Um alto grau de pigmentação com $\geq 50\%$ de pigmento nas células demonstrou ter prognóstico mais favorável, já cães com melanomas amelanóticos apresentam sobrevidas mais curtas. Por outro lado, existem resultados não previsíveis em melanomas com moderada, baixa ou sem

pigmentação, não podendo ser avaliado como fator único para o prognóstico (SMEDLEY et al., 2011, FONSECA-ALVES et al., 2021, SMEDLEY et al., 2022).

Análise histopatológica de melanomas com representação de figura de mitose e grau de pigmentação estão representados na Figura 3 abaixo.

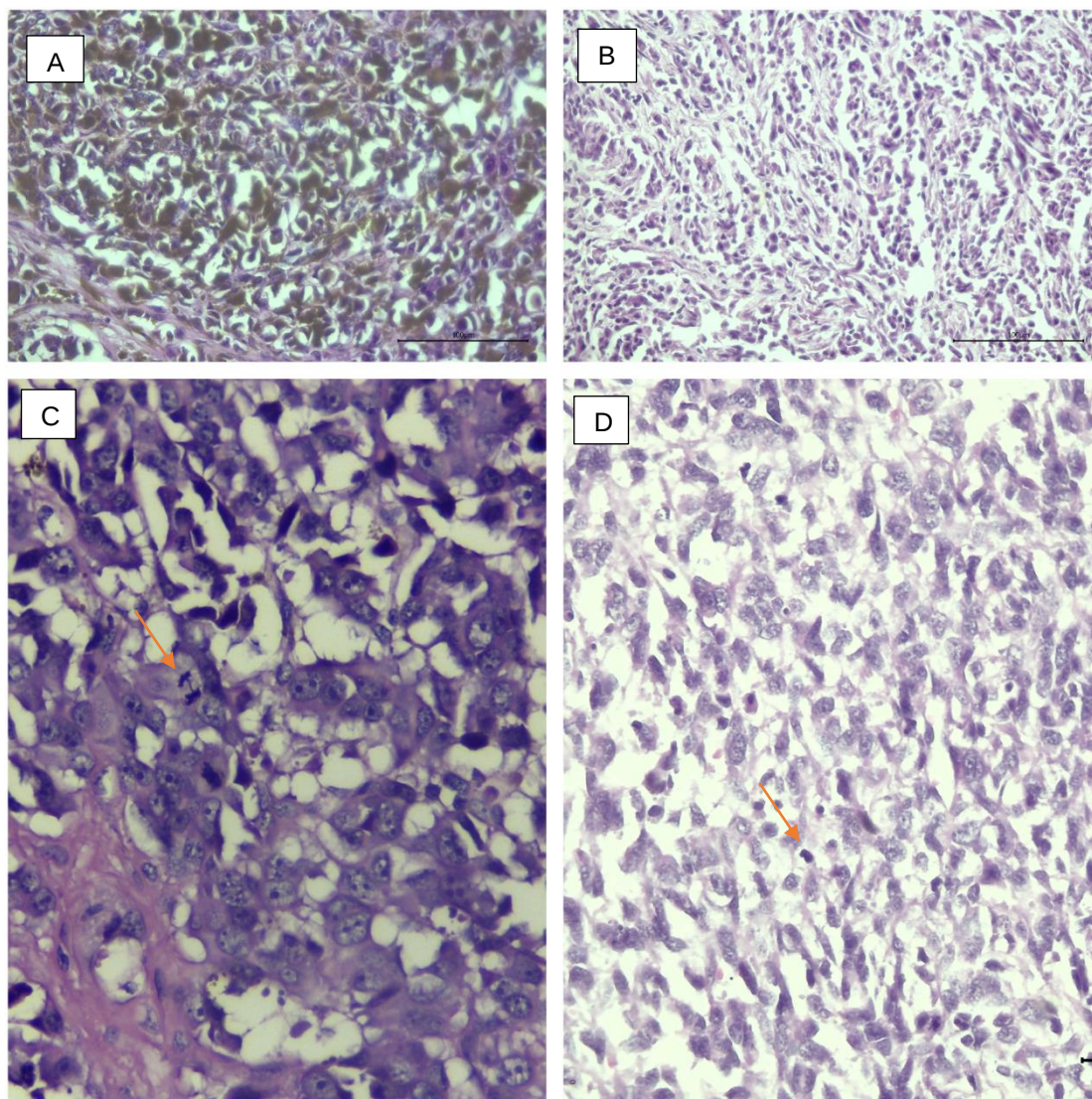


FIGURA 3: A: melanoma oral com alto grau de pigmentação (>50%); B e D: melanomas orais amelanóticos; C: figura de mitose.

O Ki-67 foi avaliado como único marcador molecular estabelecido como prognóstico para melanomas orais e cutâneos e é uma proteína nuclear que se expressa em todas as fases do ciclo celular, salvo a fase de repouso, mostrando ser mais específico que o índice mitótico que se expressa apenas na fase M (BERGIN et al., 2011, SMEDLEY et al., 2011, SMEDLEY et al., 2022). No melanoma oral canino, o valor de Ki-67 definido como limite ideal foi de $> 19,5$,

esse valor apresentou maior sensibilidade (87,1%) e maior especificidade (85,4%) para prever a sobrevida de 1 ano pós-diagnóstico, sendo valores > 19,5 de tumores com pior prognóstico (BERGIN et al., 2011).

Na busca de novos marcadores para o melanoma oral canino novos estudos estão sendo feitos com análise de DNA, RNA, imuno-histoquímica e linhagens celulares (HARDWICK, 2021).

Receptores de fator de crescimento PDGFR se mostram significativos para melanoma oral canino, tumores positivos para PDGFR α e PDGFR β têm pior prognóstico (THAMM et al., 2010, IUSSICH et al., 2017, HARDWICK, 2021).

A ativação de duas vias mitogênicas se mostra importante no melanoma oral canino envolvendo ativação de eventos e cascata de fosforilação, as vias MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) e PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) (RUSSO et al., 2009, HARDWICK, 2021), em cães a ativação dessas vias pode ser obtida através da perda do gene SPRED1 (*Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1*) e ganho do gene TRMP7 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7*) (POORMAN et al., 2015, HARDWICK, 2021). Além disso, estudos mostram que a interferência nas vias MAPK e PI3K são compartilhadas tanto pelo melanoma canino quanto pelo humano, mesmo que por diferentes mecanismos (FOWLES et al., 2015, PROUTEAU et al., 2020).

Alterações genéticas se apresentam recorrentes e prováveis de colaborar para a agressividade do melanoma oral canino, estão associadas em alterações do cromossomo *Canis familiaris* (CFA), com ganhos totais nos cromossomos 13, 17, 20, 29 e 36 e perdas totais nos CFA 2, 22 e 27. Os cromossomos 10 e 30 apresentam tanto perdas como ganhos focais (POORMAN et al., 2015, HENDRICKS et al., 2018, BROCCA et al., 2019, WONG et al., 2019, HARDWICK, 2021). Um estudo realizou PCR quantitativo e detectou amplificações focais em 49,3% dos casos no CFA 10 e em 50,7% no CFA30, a amplificação focal no CFA 30 é correlacionada com tumores de fenótipo amelanótico, alto índice mitótico e com menor tempo de sobrevida focal (PROUTEAU et al., 2020).

Outro estudo detectou ganhos e perdas afetando cromossomos, CFA 10, 13 e 30 apresentaram região de ganho recorrente, enquanto CFA 10, 11, 22 e 30 apresentaram regiões de perda. Em 37% das amostras o CFA 13 mostrou ganho de cromossomo inteiro e 25% das amostras o CFA 22 mostrou perda de

cromossomo inteiro. Genes relacionados às vias MAPK e PI3K foram os mais frequentemente envolvidos (BROCCA et al., 2019).

2.4 Tratamento e prognóstico

O tratamento cirúrgico com amplas margens, incluindo margens ósseas, bem como a linfadenectomia de linfonodos sentinelas, ainda é o padrão ouro no tratamento de melanoma oral canino (TUOHY et al., 2014, FONSECA-ALVES et al., 2021). Em um dos estudos sobre o tema, pacientes que passaram por cirurgia com amplas margens apresentam sobrevida média total de 346 dias (BOSTON et al., 2014), em outro estudo pacientes que passaram por cirurgia como único tratamento tiveram sobrevida média total de 874 dias (TUOHY et al., 2014).

A eletroquimioterapia pode ser usada como tratamento local único quando nenhuma outra terapia é possível e tem melhores respostas quando usada em tumores de até 4 cm de diâmetro e sem invasão óssea (TELLADO et al., 2020). Seu uso também é proposto como tratamento adjuvante em neoplasias de difícil ressecção cirúrgica, principalmente para garantir margens mais amplas em tecidos moles (FONSECA-ALVES et al., 2021). Um estudo mostrou que a eletroquimioterapia usada no tratamento para melanomas orais, quando outras terapias não foram possíveis, mostrou sobrevida média de 16,5 meses no estágio I, 9 meses no estágio II, 7,5 meses no estágio III e 4,5 meses para pacientes no estágio IV (TELLADO et al., 2020).

A radioterapia também pode ser usada como tratamento adjuvante à cirurgia ou como tratamento único paliativo, e mostrou-se mais eficaz na doença microscópica do que na macroscópica (LADUE et al., 1999, PAZZI et al., 2022). Um estudo avaliou radioterapia paliativa em melanomas orais que não foram submetidos a cirurgia, a sobrevida média foi de 390 dias no estágio I, 286 dias no estágio II, 159 dias no estágio III e 90 dias no estágio IV (CUNHA et al., 2018, FONSECA-ALVES et al., 2021).

O tratamento do melanoma oral canino ainda é desafiador e por isso outras estratégias são estudadas, o auxílio do sistema imunológico no câncer é apoiado pela medicina baseada em evidência, as imunoterapias mais pesquisadas envolvem anticorpos monoclonais, imunoterapia gênica,

imunoterapia específica ativada por bactérias e terapia com células assassinas ativadas por linfocinas (ALMELA & ANSÓN, 2019).

Alguns exemplos como anticorpos monoclonais, o bloqueio da via PD-1/PD-L1 suprime a ativação de células T específicas para antígenos tumorais, interromper este caminho repararia muitas funções de efeito das células T antígeno-específicas com consecutiva remissão do câncer (MAEKAWA et al., 2017, ALMELA & ANSÓN, 2019).

Outra estratégia como o uso de vacinas contra o câncer, as células cancerígenas empregam várias táticas para adiar, modificar e até mesmo suspender a imunidade tumoral (FONSECA-ALVES et al., 2021, GARCIA et al., 2022), o objetivo da vacina é induzir resposta imune antitumoral, podendo ser usadas células dendríticas que são células apresentadoras de antígenos para vincular sistemas imunes inato e adaptativo, outra estratégia terapêutica seria ativação de uma resposta imune capaz de eliminar células neoplásicas e produzir imunidade duradoura (CAVALLO et al., 2014, ALMELA & ANSÓN, 2019). Um estudo avaliou o uso de células dendríticas autólogas derivadas da medula óssea, as quais foram expandidas *ex vivo* e transfectadas com um adenovírus expressando o antígeno do melanoma humano gp 100, a vacina foi administrada por via subcutânea em 3 cães: 1 saudável e 2 com melanoma oral estágio I e III após excisão cirúrgica e radioterapia, 2 dos cães vacinados tiveram tempo livre de doença de 48 e 22 meses após a vacinação (GYORFFY et al., 2005, ALMELA & ANSÓN, 2019).

O tratamento do melanoma oral canino ainda é desafiador e o uso de terapias convencionais somente pode não ser suficiente, o desenvolvimento de uma estratégia de tratamento multimodal parece ser promissor (ALMELA & ANSÓN, 2019, FONSECA-ALVES et al., 2021).

2.5 CFA 10

Os oncogenes localizados no CFA 10 de melanomas orais caninos demonstraram níveis de expressão positivamente correlacionados ao número de cópias de DNA, sendo eles MDM2 e CDK4 (*Cyclin-dependent kinase 4*), e essas amplificações ligadas a uma maior quantidade de proteína, sugerindo obtenção de novas habilidades celulares com características de malignidade nas células de melanoma (PROUTEAU et al., 2022). Estudos já demonstraram a

amplificação do oncogene MDM2 (*Mouse double minute 2*) em melanomas de mucosa humana e canina com expressivo ganho no número de cópias, o MDM2 é um importante regulador negativo do gene supressor de tumor p53 (WADE et al., 2006, WONG, et al., 2019).

O CDK4 está envolvido na fase inicial do ciclo celular, regulando a proteína *Cyclin D1* permitindo ou não a transcrição da fase G1 para S, e é frequentemente amplificado no melanoma oral humano. A amplificação do cromossomo 12q foi a mais observada (57,9%) e abrangeu a região 12q14, que contém o oncogene CDK4 (LYU, et al., 2018, BROCCA, et al., 2019). A alta expressão da proteína *Cyclin D1* em melanomas orais caninos tem sido documentada recentemente (BROCCA, et al., 2019, ZAMBONI, et al., 2020).

Em um estudo de comparação citogenética de lesões melanocíticas caninas primárias foi observado que várias regiões do genoma eram sugestivas de mudanças estruturais, representadas por um ganho no número de cópias seguido imediatamente por uma perda, a maioria principalmente em CFA 10 e CFA 30 (POORMAN et al., 2015).

2.6 CFA 30

Assim como nos melanomas humanos, os melanomas caninos dependendo da malignidade e localização anatômica possuem características citogenéticas diferentes, um importante indicativo é a presença de uma anomalia característica no CFA 30 em melanomas orais, que não é evidente nos melanomas cutâneos (POORMAN et al., 2015).

Um estudo avaliou o DNA de 49 melanomas caninos, sendo 44 orais e 5 cutâneos e 18 melanocitomas usando oligo array CGH (oaCGH) por co-hibridização de DNA tumoral, e os melanocitomas apresentaram menos aberrações no número de cópias do que os melanomas. Enquanto a aberração mais frequente foi de um complexo número de cópias específico no perfil do CFA 30 de melanomas orais, presente em 60% dos casos e com a característica de um rearranjo cromossômico estrutural, devido à alta incidência desse complexo de aberrações de número de cópias é possível que o mesmo seja importante para o desenvolvimento ou progressão de fenótipos malignos. No espaço dessa região complexa de aberrações no número de cópias do CFA 30 estão nove genes, sendo os principais SPRED1 com perda de número de cópias e com o

papel de ser supressor da ativação de Ras/MAPK e com superexpressão de TRPM7 com ganho de número de cópias que está envolvido na regulação da via de sinalização MAPK, via esta que é responsável pela proliferação e progressão do tumor (POORMAN et al., 2015).

Outros estudos encontraram genes com perdas no número de cópias no CFA 30 que englobam dois reguladores mitóticos envolvidos na segregação cromossômica: KNSTRN (*Kinetochore Localized Astrin (SPAG5) Binding Protein*) e BUB1 (*Budding uninhibited by benzimidazoles 1*) (BROCCA et al., 2019, WONG et al., 2019, HARDWICK, 2021). Melanomas apresentam transcrições significativamente mais baixas de BUB1 quando comparadas com as de tecido normal (HITTE et al., 2019, HARDWICK, 2021). A perda no número de cópias nas regiões que envolvem os genes BUB1 e KNSTRN foi observado tanto em melanomas caninos quanto em melanomas humanos (WONG et al., 2019).

Um estudo avaliou a amplificação focal de uma região de 600 kb do CFA 30 de melanomas orais visando BUB-1 (7.3 Mb) e TRPM7 (16.5 Mb) por meio de PCR quantitativo. A amplificação focal do CFA 30 foi detectada em 50,7% dos casos, porém sempre na região de 16.5 Mb, sendo 7.3 Mb não amplificado, o que concorda com o fato de a região 16.5 Mb (TRPM7) ser uma região de ganho e a 7.3 Mb ser uma região de perda. Além disso, o estudo mostra uma provável associação entre a amplificação focal do CFA 30 e um pior prognóstico (PROUTEAU et al., 2020).

A superexpressão do gene TRPM7 correspondente à amplificação focal do CFA 30 (região 16-17 Mb) já foi observada em alguns melanomas humanos, e um novo estudo identificou que TRPM7 está envolvido na proliferação tumoral de melanomas caninos e humanos não induzidos por UV (PROUTEAU et al., 2022).

2.7 PCR quantitativo

A reação em cadeia polimerase quantitativa (PCR quantitativo) é um ótimo método para determinação e quantificação de sequências específicas de ácidos nucleicos com precisão em amostras biológicas e ambientais (TAYLOR et al., 2019). Possui vantagem em relação ao método tradicional de PCR baseado em gel, pois a expressão gênica pode ser visualizada "em tempo real" através do

uso de moléculas fluorescentes e por meio de um computador (HAWKINS & GUEST et al., 2017).

O PCR quantitativo permite que a amplificação e detecção ocorram simultaneamente e o resultado é visualizado em tempo real durante a amplificação da sequência de interesse (HAWKINS & GUEST et al., 2017).

O processo de PCR ocorre em etapas, como caracterizado na Figura 4, começa com a desnaturação em uma temperatura de 95°C onde ocorre a separação das fitas de DNA por meio da quebra das ligações por pontes de hidrogênio das cadeias de nucleotídeos, posteriormente acontece o anelamento em uma temperatura de 55 a 60°C, os *primers* se ligam às suas sequências complementares de DNA (a região que se pretende amplificar) e servem como iniciadores para a enzima taq polimerase que se liga a fita sinalizada pelo *primer*, começa então a extensão, aos 72°C, do novo fragmento de DNA, formando novamente uma fita dupla (molde). São realizados aproximadamente de 40 a 60 ciclos como este, promovendo a amplificação de determinada região que se pretende analisar, durante a amplificação, a quantificação é determinada pela quantidade de produto amplificado durante cada ciclo, através da fluorescência emitida pelos fluoróforos. Esta metodologia utiliza um equipamento com sistema de monitoramento da emissão da fluorescência (WILHELM & PINGOUD, 2003, KUBISTA et al., 2006).

O PCR quantitativo em tempo real é usado para determinar cargas virais, expressão gênica, títulos de contaminações (em alimentos, sangue, outros fluidos e tecidos corporais), desequilíbrios alélicos e os graus de amplificação e deleção de genes. Além de ser utilizada para diagnóstico de tumores, como para a detecção e monitoramento de doenças residuais mínimas, a identificação de micrometástases em câncer, quantificar amplificações de oncogenes, bem como deleções de genes supressores de tumor, entre outros (WILHELM & PINGOUD, 2003).

A interpretação dos resultados do PCR quantitativo pode ser analisada por meio da curva de amplificação, a amplificação seletiva de sequências específicas do DNA alvo que se deseja estudar, a curva de amplificação é expressa pelas fases exponencial, linear e platô. Durante a amplificação, um software constrói em tempo real um gráfico relacionando os ciclos de

termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA nas amostras, ciclo a ciclo (KUBISTA et al., 2006).

Outro método de análise do PCR quantitativo é a "melting curve" (curva de fusão), a temperatura de fusão é a temperatura na qual 50% do DNA é desnaturado, representado por uma curva que atinge um pico máximo de temperatura. Quando a temperatura aumenta a fita dupla começa a se dissociar, levando a um aumento na intensidade de absorção, hipercromicidade (TOMAZ et al., 2016).

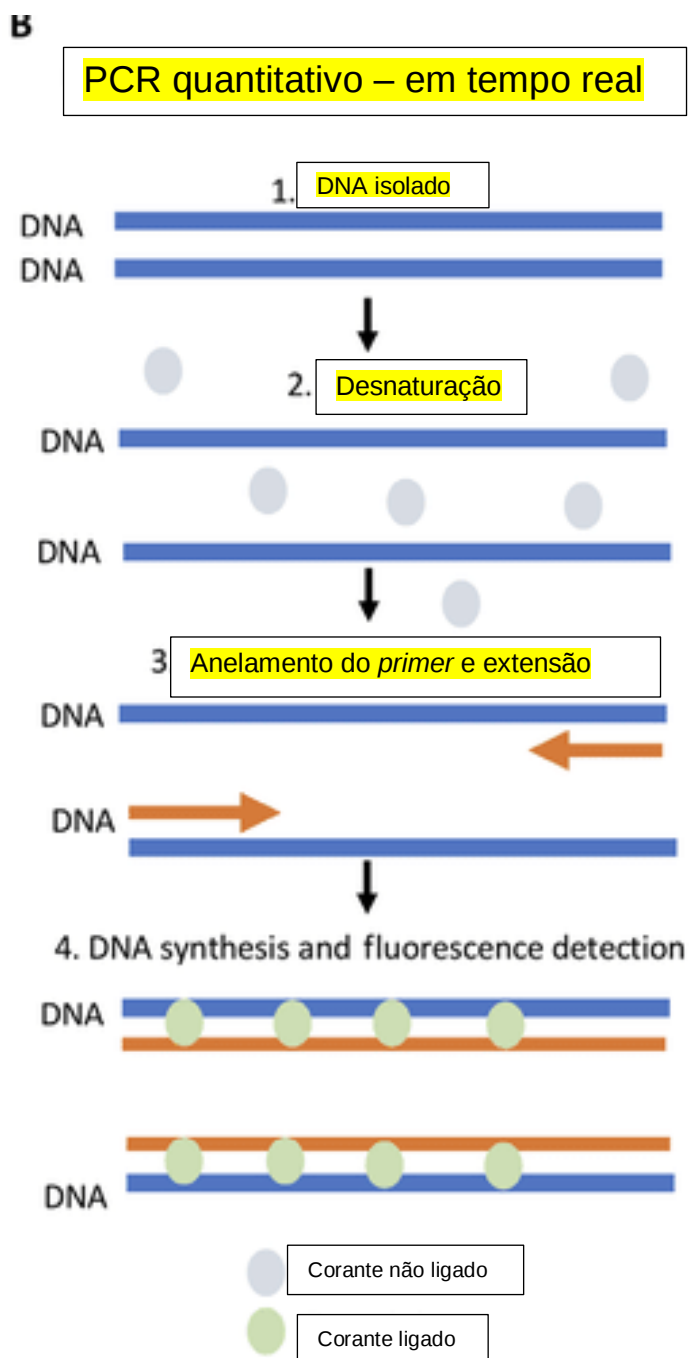


FIGURA 4: PCR Quantitativo

REFERÊNCIAS

ALMELA, Ramón M.; ANSÓN, Agustina. A review of immunotherapeutic strategies in canine malignant melanoma. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 1, p. 15, 2019.

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

BERGMAN, Philip J; SELMIC, Laura e; KENT, Michael s. Melanoma. In: VAIL, David M; THAMM, Douglas H; LIPTAK, Julius M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2020. Cap. 20. p. 367-381.

BORIA, Pedro A. et al. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 3, p. 388-394, 2004.

BOSTON, Sarah E. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 4, p. 401-407, 2014.

BROCCA, Ginevra et al. Array comparative genomic hybridization analysis reveals significantly enriched pathways in canine oral melanoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1397, 2019.

CAVALLO, Federica et al. Xenogene vaccination in the therapy of cancer. **Expert opinion on biological therapy**, v. 14, n. 10, p. 1427-1442, 2014.

CUNHA, Simone Carvalho dos Santos et al. Radiation therapy for oral melanoma in dogs: A retrospective study. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

DOBSON, Jane M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

FREEMAN, Kim P. et al. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987–1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2003.

FONSECA-ALVES, Carlos Eduardo et al. Current status of canine melanoma diagnosis and therapy: report from a colloquium on canine melanoma organized by ABROVET (brazilian association of veterinary oncology). **Frontiers in Veterinary Science**, p. 913, 2021.

FOURNIER, Quentin et al. Investigation of the utility of lymph node fine-needle aspiration cytology for the staging of malignant solid tumors in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, p. 489-500, 2018.

FOWLES, J. S.; DENTON, C. L.; GUSTAFSON, D. L. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 3, p. 288-304, 2015.

GARCIA, Jéssica Soares et al. Association of systemic inflammatory and immune indices with survival in canine patients with oral melanoma, treated with experimental immunotherapy alone or experimental immunotherapy plus metronomic chemotherapy. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

GILLARD, Marc 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.

GYORFFY, Steve et al. Bone marrow-derived dendritic cell vaccination of dogs with naturally occurring melanoma by using human gp100 antigen. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 1, p. 56-63, 2005.

HARDWICK, Laura. A Comparative View on Molecular Alterations and Potential Therapeutic Strategies for Canine Oral Melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 11, p. 286, 2021.

HAWKINS, Steve FC; GUEST, Paul C. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. **Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications**, p. 125-133, 2017.

HENDRICKS, William PD et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. **PLoS genetics**, v. 14, n. 9, p. e1007589, 2018.

HITTE, Christophe et al. Genome-wide analysis of long non-coding RNA profiles in canine oral melanomas. **Genes**, v. 10, n. 6, p. 477, 2019.

IUSSICH, Selina et al. PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 2, p. 462-469, 2017.

KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LADUE, Tracy A. et al. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 40, n. 3, p. 312-317, 1999.

LYU, Jiong et al. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. **The Journal of Pathology**, v. 244, n. 3, p. 358-366, 2018.

MAEKAWA, Naoya et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

MELLMAN, Ira; COUKOS, George; DRANOFF, Glenn. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480-489, 2011.

NISHIYA, Adriana Tomoko et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

PALMA, Stefano Di et al. Review on canine oral melanoma: an undervalued authentic genetic model of human oral melanoma?. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 5, p. 881-889, 2021.

PAZZI, Paolo; STEENKAMP, Gerhard; RIXON, Anouska J. Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 196, 2022.

PEREIRA, Ethel R. et al. Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice. **Science**, v. 359, n. 6382, p. 1403-1407, 2018.

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

PROUTEAU, Anais; ANDRÉ, Catherine. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 501, 2019.

PROUTEAU, Anais et al. Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 2, p. 214-223, 2020.

PROUTEAU, Anais et al. Canine oral melanoma genomic and transcriptomic study defines two molecular subgroups with different therapeutical targets. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 276, 2022.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RUSSO, Alessia E. et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. **International journal of oncology**, v. 34, n. 6, p. 1481-1489, 2009.

SANBORN, J. Zachary et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 35, p. 10995-11000, 2015.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.

SMEDLEY, Rebecca C. et al. Diagnosis and Histopathologic Prognostication of Canine Melanocytic Neoplasms: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2022.

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.

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

SPUGNINI, Enrico P. et al. Local control and distant metastasis after electrochemotherapy of a canine anal melanoma. **in vivo**, v. 21, n. 5, p. 897-899, 2007.

SPUGNINI, Enrico Pierluigi; BALDI, Alfonso. Electrochemotherapy in veterinary oncology: state-of-the-art and perspectives. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 5, p. 967-979, 2019.

TAYLOR, Sean C. et al. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761-774, 2019.

TELLADO, Matías Nicolás et al. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. **Radiology and oncology**, v. 54, n. 1, p. 68-78, 2020.

THAMM, Douglas H. et al. RT-PCR-based tyrosine kinase display profiling of canine melanoma: IGF-1 receptor as a potential therapeutic target. **Melanoma research**, v. 20, n. 1, p. 35-42, 2010.

TSOI, Mayra F. et al. Quantitative expression of TYR, CD34, and CALD1 discriminates between canine oral malignant melanomas and soft tissue sarcomas. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 701457, 2021.

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

VON EULER, Henrik et al. Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma. **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 4, p. 377-384, 2008.

WADE, Mark et al. Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33036-33044, 2006.

WILHELM, Jochen; PINGOUD, Alfred. Real-time polymerase chain reaction. **Chembiochem**, v. 4, n. 11, p. 1120-1128, 2003.

WILLIAMS, Laurel E.; PACKER, Rebecca A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1234-1236, 2003.

WONG, Kim et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

ZAMBONI, Clarissa et al. Cyclin D1 immunohistochemical expression and somatic mutations in canine oral melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 18, n. 2, p. 231-238, 2020.

HIPÓTESE

As ampliações somáticas encontradas em CFA 10 e CFA 30 no melanoma oral canino podem estar correlacionadas com os fatores prognósticos já estabelecidos e ser usada como ferramenta no prognóstico desta neoplasia.

OBJETIVOS

Gerais

Avaliar as ampliações somáticas focais nos cromossomos 10 e 30 no melanoma oral canino e associar com fatores clínico patológicos.

Específicos

- Avaliar as ampliações somáticas focais nos cromossomos 10 e 30 em melanoma oral canino.
- Comparar as ampliações somáticas focais nos cromossomos 10 e 30 em melanoma oral e correlacionar com fatores prognósticos histopatológicos, como índice mitótico e pigmentação.
- Comparar as ampliações somáticas focais nos cromossomos 10 e 30 em melanoma oral e correlacionar com fatores prognósticos clínicos, como sobrevida média global.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Avaliação prognóstica das amplificações somáticas focais dos cromossomos 10 e 30 no melanoma oral canino e sua correlação histopatológica e clínica

Abstract

Canine oral melanoma is the main malignant neoplasm of the oral cavity in dogs, and it is considered a very aggressive disease. The metastatic rate is round 80% and can spread to regional lymph nodes, lungs and other organs. Recent studies demonstrated that alterations in human and canine melanoma gene expression share activation and sensitivity to inhibition of cancer-related signaling pathways, the gain and/or loss in copy number can alter the level of expression of oncogenes and acquire tumor advantages conferred by these focal amplifications causing a structural chromosomal rearrangement. The aim of this study was to evaluate focal amplifications on chromosomes 10 and 30 (*Canis Familiaris* 10 and 30) using quantitative PCR of canine oral melanoma and correlate them with clinical and pathological aspects. 45 tumors were analyzed and as a result there was no focal amplification for the CFA 30 in the evaluated samples, for the MDM2 gene of the CFA 10 only two samples presented amplification and in the CDK4 gene all samples presented amplification, as a pattern between the samples cannot be defined. amplifications found and the prognostic factors analyzed, no relevance was identified in the clinical routine for these markers.

KEYWORDS: melanocytic tumors, quantitative PCR, CFA10, CFA30.

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é a principal neoplasia de cavidade oral em cães, sendo responsável por 56% dos casos (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020). Os locais de maior prevalência desse tipo de neoplasia são gengiva e lábios, mas podem acometer palato, tonsilas, língua e faringe (RAMOS-VARA et al., 2000, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019, PALMA et al., 2021).

Algumas raças mais propensas a desenvolver a forma oral do melanoma são Poodles, Golden Retrievers, Labradores, Rottweilers, Yorkshire Terriers, Cocker Spaniels, Chow-Chows, Scottish Terriers e Daschunds. A idade média no momento do diagnóstico é de aproximadamente 10 a 11 anos (RAMOS-VARA et al., 2000, DOBSON, 2013, GILLARD et al., 2014, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019).

O índice mitótico tem valor prognóstico em termos de probabilidade de sobrevivência, neoplasias com figuras de mitose acima de 4 mitoses em 10 campos de 400x tem pior prognóstico. Melanomas amelanóticos foram associados a um índice mitótico maior, em comparação com neoplasias com pigmentos melânicos no citoplasma. Na análise imuno-histoquímica, o aumento da expressão do marcador molecular Ki-67 está correlacionado com propensão metastática moderada a alta (SMEDLEY et al., 2011, BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020, SMEDLEY et al., 2022).

O tratamento padrão ouro ainda é a cirurgia com amplas margens, incluindo margens ósseas e linfadenectomia (TUOHY et al., 2014). Como terapias adjuvantes à cirurgia ou mesmo como terapia única paliativa em melanomas de difícil remoção cirúrgica são usadas eletroquimioterapia e radioterapia (FONSECA-ALVES et al., 2021). Por ser uma neoplasia desafiadora outras estratégias terapêuticas vêm sendo estudadas, as imunoterapias principalmente, as mais pesquisadas envolvem anticorpos monoclonais, imunoterapia gênica, imunoterapia específica ativada por bactérias e terapia com células assassinas ativadas por linfocinas (ALMELA & ANSÓN, 2019).

Alterações na expressão gênica do melanoma humano e canino compartilham ativação e sensibilidade à inibição de vias de sinalização relacionadas ao câncer (FOWLES et al., 2015), o ganho e/ou perda no número de cópias no DNA pode alterar o nível de expressão de oncogenes e adquirir

vantagens tumorais conferidas por esses genes focais amplificações causando um rearranjo cromossômico estrutural (PALMA et al., 2021, PROUTEAU et al., 2022).

Em um estudo de comparação citogenética de lesões melanocíticas caninas primárias foi observado que várias regiões do genoma eram sugestivas de mudanças estruturais, representadas por um ganho no número de cópias seguido imediatamente por uma perda, a maioria principalmente em CFA 10 e CFA 30 (POORMAN et al., 2015).

Alterações genéticas somáticas são importantes para determinarmos o comportamento biológico das neoplasias, como também encontrar alvos terapêuticos possíveis que auxiliem no tratamento (HENDRICKS et al., 2018, WONG et al., 2019). Na genética do melanoma oral canino, o cromossomo canino, *Canis Familiaris* (CFA) é caracterizado por diversos ganhos ou perdas em regiões cromossômicas, com essa análise determinam-se as alterações no número de cópias (HENDRICKS et al., 2018, WONG et al., 2019). Em estudo recente, amplificações focais de CFA 30 foram frequentemente encontradas no melanoma oral canino e estão associadas a um resultado ruim e a outros fatores prognósticos como um alto índice mitótico e fenótipo amelanótico (POORMAN et al., 2015, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019, PROUTEAU et al., 2020). A taxa de sobrevida média observada para cães com amplificações em CFA 30 foi de 159 dias, contra 317 dias de cães sem amplificações (PROUTEAU et al., 2020).

Outro cromossomo que frequentemente foi associado a mudanças estruturais no genoma de melanomas orais caninos foi o CFA 10, apresentando ganho no número de cópias seguido de perda e associado a oncogenes que também apresentaram relevância no melanoma de mucosa humano (POORMAN et al., 2015, BROCCA, et al., 2019, ZAMBONI, et al., 2020, PROUTEAU, et al., 2022).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar amostras de melanomas orais caninos, realizar avaliação histopatológica, levantamento de dados clínicos e através de PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo em tempo real avaliar as amplificações focais nos cromossomos CFA 10 e CFA 30, especificamente os oncogenes MDM2 e CDK4 expressos em CFA 10 e BUB-1 e TRPM7 expressos em CFA 30 e correlacionar possíveis mutações nestes

genes com aspectos patológicos como grau de pigmentação e índice mitótico e aspectos clínicos como sobrevida média global.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de melanoma oral canino e levantamento de dados clínicos

As amostras de melanomas orais caninos foram obtidas do Serviço do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do Serviço de Patologia da FMVZ - UNESP Botucatu. O uso das amostras para realização dessa pesquisa foi autorizado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais – UNESP Botucatu (Protocolo CEUA 0123/2022).

Foi realizada avaliação histopatológica de 80 amostras de melanomas orais de cães obtidas a partir do acervo do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu, os dados foram fornecidos pelos mesmos Departamentos a partir das fichas dos pacientes e contato com os tutores. Destas 80 amostras, somente 45 apresentavam dados clínicos suficientes (informações sobre tratamento, linfonodo, metástase à distância e se a causa do óbito foi a neoplasia) para avaliação necessária do presente estudo.

2.2 Exame histopatológico

Em um total de 45 amostras de blocos de parafina de melanoma oral canino foram realizados cortes de 4µm de espessura com micrótomo e foram distendidos em lâminas de vidro para microscópio sendo posteriormente coradas pela técnica de eosina e hematoxilina (HE), para visualização em microscópio óptico com objetivo de fazer a análise histopatológica.

A avaliação histopatológica foi usada para confirmação do diagnóstico e análise de dois fatores prognósticos: contagem de mitoses (número de figuras de mitose em 10 campos de 400x de aumento) e a porcentagem de pigmentação. Sendo usado como nota de corte o índice mitótico de ≥ 4 figuras

de mitose e avaliação de intensidade de pigmentação em: amelanico (confirmados por meio de imuno-histoquímica), leve, moderada e intensa.

A avaliação histopatológica foi feita por dois patologistas e as divergências foram discutidas e resolvidas por consenso.

2.3 Extração do DNA genômico

Para a realização da extração do DNA genômico necessário para a posterior realização da técnica de PCR quantitativo, foram realizados 4 cortes de 7µm em micrótomo dos blocos de parafina de cada uma das 45 amostras de melanomas orais caninos e da amostra de tecido normal de cão e foram armazenados em tubos de microcentrífuga estéreis e livres de DNase de 1,5 ml.

O DNA genômico foi extraído usando um kit FFPE Tissue DNA (Extraction of DNA from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue, Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

A extração de DNA foi bem-sucedida nas 45 amostras, o DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria. Também foi utilizado como controle externo uma amostra de tecido normal de cão, neste caso amostra de próstata normal de cão congelada e foi realizado a extração de material genético dela para comparação com material genético das amostras tumorais.

2.4 PCR quantitativo

Após realizada a extração do DNA genômico de cada amostra, estas foram divididas nas soluções de trabalho e nas soluções de estoque. A partir das soluções de trabalho foi realizado um *mix* com as amostras de DNA genômico, a solução dos fluoróforos, a solução com os *primers* e H₂O e este *mix* de cada amostra foi transferido para a microplaca de PCR de 384 poços compatível com QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System, Applied Biosystems by life technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States. Os PCRs foram realizados no Laboratório de Pesquisa NeoGene da Unipex, UNESP, campus Botucatu.

O fluoróforo utilizado foi SYBR Green (PowerUp SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States).

Os *primers* utilizados foram desenvolvidos por Invitrogen Custom Primers, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States: CFA 10 (MDM2 gene) F: AGTGCCAAGCTTCTCTGTGA e R: ACCCAGTCACACAGCTAGTA; CFA 10 (CDK4 gene) F: AGATACAGCCGACACTCCA e R: AGCAAGAGGGGAGTAGGAGA; CFA 30 (BUB-1 gene) F: CCAGGCTCCGGTTGTA ACT e R: CCAAACCTGAAGTCATTCTGC; CFA 30 (TRPM7 gene) F: GGAGATGAGTGGGAGCTGAG e R: ATGCCAATCTGCAAAGATCC.

Foi usado como controle interno dos cromossomos 10 e 30 um *primer* visando uma região do cromossomo 9 (CFA 9 (controle) *Forward (F)/Reverse (R)*: F: GCCCAACTCACTGGACTTTG e R: CAACTCCATCTGGGAGCATT) pois este demonstrou ter maior estabilidade no número de cópias em estudos já realizados (HITTE et al., 2019, WONG et al., 2019, PROUTEAU et al., 2020), para avaliação da técnica do PCR.

Todas as 45 amostras de melanoma oral canino e a amostra controle de tecido normal de cão apresentaram curva de amplificação satisfatória para identificação do PCR como mostrado na Figura 5, e após foi feita a análise das curvas de efusão geradas.

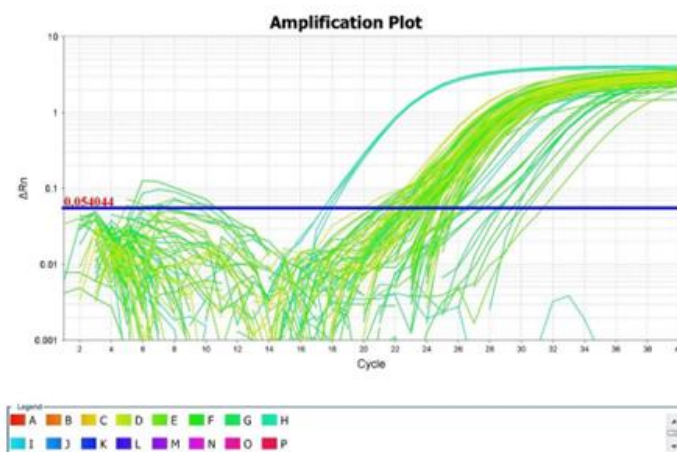
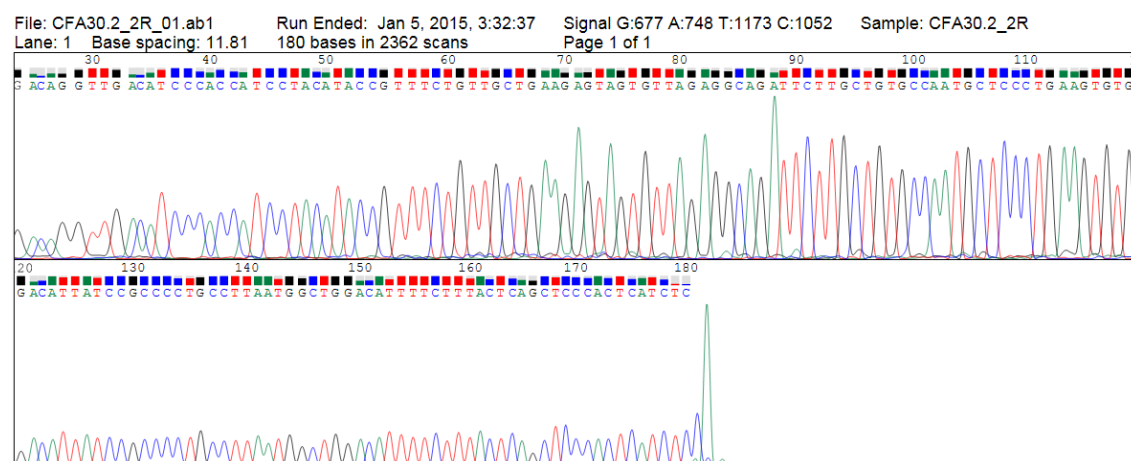
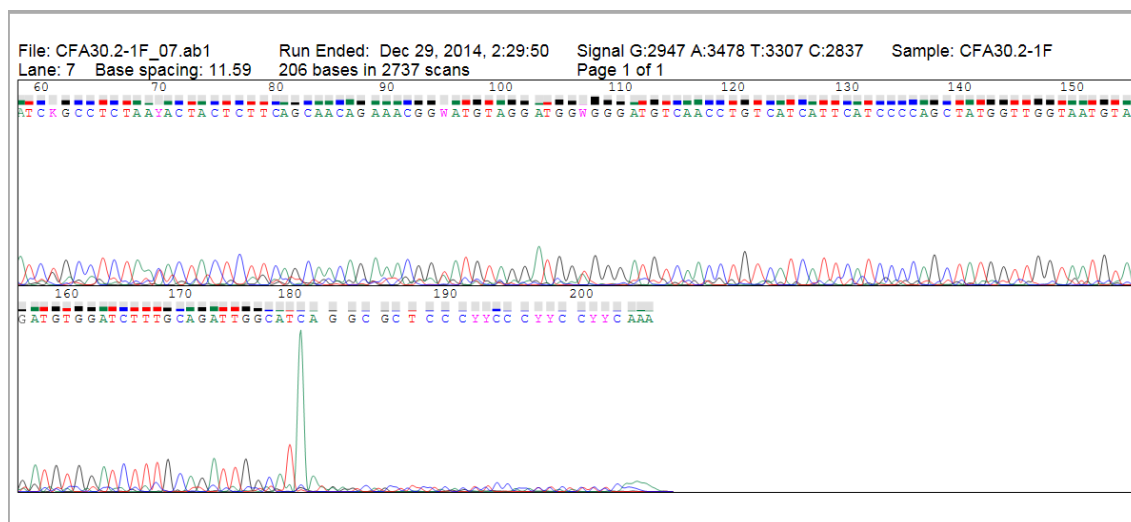


FIGURA 5: Amplificações satisfatórias das amostras de melanoma oral canino e da amostra controle de tecido normal.

Também foi realizado o sequenciamento genético das regiões cromossômicas avaliadas (CFA 9 controle e regiões dos oncogenes avaliados em CFA 10 e CFA 30) na amostra controle de tecido normal canino e mais quatro

amostras de melanoma oral para certificação da região correta no caso da amostra controle e da presença de mutação ou não nas amostras de melanoma.

O sequenciamento genético foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Unipex, UNESP, campus Botucatu. Sequenciamento genético da região do gene TRPM7 do cromossomo 30 na amostra controle mostrando que a região está correta representado nas Figuras 6a e 6b.



FIGURAS 6a e 6b: Sequenciamento da região do gene TRPM7 do CFA30.

2.5 Análise estatística

Considerando nossos resultados, optamos por realizar análise estatística descritiva, com dados tabulados em Excel, e apresentados na forma de frequência e porcentagem.

3. RESULTADOS

O levantamento de dados clínicos das amostras de melanoma oral canino mostrou que de 45 tumores, 19 cães eram fêmeas e 26 machos. A idade média dos cães foi de 12,6 anos. Quanto a prevalência de raças, 15 cães eram sem raça definida, 7 cães da raça Cocker Spaniel, 7 da raça Dachshund, 3 Golden Retriever, 3 Poodles e demais raças descritas na Tabela 1.

Sobre a informação de acometimento de linfonodo regional, 39 cães apresentavam esta informação e 24 tinham comprometimento metastático, sendo todos estes linfonodos mandibulares. Apenas 6 cães apresentavam metástase à distância no momento do diagnóstico.

Todos os cães avaliados passaram por procedimento cirúrgico e 43 por tratamentos adjuvantes, sendo a maioria vacina e/ou eletroquimioterapia como mostrado na Tabela 1.

A sobrevida média global dos cães avaliados foi de 140 dias [intervalo (22-1040)] e este dado também encontra-se representado na Tabela 1, assim como tamanho dos tumores, margens cirúrgicas, recidiva e presença de metástase.

TABELA 1: Dados clínicos das amostras de melanoma oral canino (SI: Sem informação; F: Fêmea; M: Macho; A: Acometido; NA: Não acometido; EQT: Eletroquimioterapia; QT: Quimioterapia).

AMOSTRA	SEXO	IDADE (anos)	RAÇA	TAMA NHO DO TUM OR	MARGENS CIRÚRGICAS	LINFONODO	TRATA MENTO	RECIDIVA	METÁST ASE	SOBREVIDA (dias)
1	F	14	Cocker Spaniel	3x2x1, 5 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Sim, após 2 meses	Não	91
2	M	SI	SRD	4x3x4 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Sim, após 1 mês	Não	95
3	M	10	Basset Hound	1,5x0, 9x2 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Sim, após 3 meses	Não	105
4	M	9	Pequinês	2,2x1, 5x1 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT, QT	Não	Não	73

5	M	15	Dachshund	2x1,5x 0,3 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	157
6	M	9	Golden Retriever	4x3x2, 5 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	36
7	M	13	SRD	4x3,5x 2,5 cm	SI	A	Só Cirurgia	Não	Não	507
8	M	10	Poodle	2,8x1, 6x1,4 cm	Completas	A	Vacina, EQT	Sim, após 2 meses	Não	101
9	M	SI	SRD	SI	SI	SI	Vacina, EQT	Sim	Não	32
10	F	12	Dachshund	6x4,5x 4 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	130
11	M	11	Yorkshire	3x2,5x 1,4 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Não	Não	217
12	M	15	Cocker Spaniel	6x4x2 cm	Incompletas	A	EQT	Não	Não	30
13	F	14	SRD	1x0,5x 0,1 cm	Incompletas	NA	Vacina	Sim	Sim	112
14	F	15	Cocker Spaniel	5x5x2, 5 cm	Incompletas	A	Vacina	Não	Não	22
15	F	12	Yorkshire	2x2x2 cm	Completas	NA	Vacina, EQT	Não	Não	352
16	M	13	SRD	5x4x3 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	194
17	M	15	Poodle	5x4x2, 8 cm	Completas	A	Vacina	Não	Não	31
18	F	11	Golden Retriever	2,5x1, 8x1 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Sim	Não	29
19	M	15	Dachshund	6x4x3 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Sim	Não	61
20	F	12	Golden Retriever	3,5x2x 1,5 cm	Completas	A	Vacina, EQT	Sim	Não	135
21	M	15	SRD	3,9x3, 7x3,4 cm	SI	NA	Não	Não	Não	112
22	F	8	Beagle	4x3x2 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Não	Não	907
23	M	13	Akita	4,5x3x 3 cm	SI	NA	EQT	Não	Não	183

24	M	11	Dachshund	5x5x5 cm	SI	NA	Vacina	Não	Não	56
25	F	12	Pug	4,7x2, 6x2 cm	Completas	A	Vacina	Não	Não	38
26	F	13	Cocker Spaniel	6x6x6 cm	Incompletas	A	Vacina	Não	Não	26
27	F	10	Pit bull	5x2,5x 2 cm	SI	NA	Vacina	Não	Não	33
28	F	14	Dachshund	3x2,5x 1,4 cm	Completas	A	Vacina, EQT	Não	Não	1040
29	M	13	Akita	2,5x2, 5x2,5 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Não	Sim	61
30	F	16	Dachshund	2x2x2 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	159
31	F	14 anos	Cocker Spaniel	4x3x3 cm	Incompletas	SI	Vacina, EQT	Não	Não	141
32	M	13	Poodle	SI	Incompletas	A	Vacina, EQT	Sim	Não	74
33	M	12	SRD	4x2,5x 1,5 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Sim	Sim	11
34	M	14	Cocker Spaniel	4x3x3 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	31
35	M	11	SRD	3x1,5x 1,4 cm	Incompletas	A	Vacina	Não	Não	32
36	F	13	SRD	2,8x2x 1,5 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Não	98
37	M	13	Cocker Spaniel	SI	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Sim	33
38	F	15	SRD	SI	SI	SI	Vacina, EQT	Não	SI	30
39	M	9	SRD	SI	SI	SI	QT	Sim	SI	90
40	M	15	SRD	SI	SI	NA	EQT	Não	Não	30
41	F	16	SRD	SI	SI	SI	Vacina	Sim	SI	180
42	F	9	Lhasa Apso	SI	SI	A	Vacina, QT	Não	Sim	60
43	F	12	SRD	SI	SI	SI	Vacina, EQT, QT	Sim	SI	150
44	M	14	Dachshund	3x2x0, 5 cm	Incompletas	A	Vacina, EQT	Não	Sim	120

45	M	13	SRD	4x2x1, 5 cm	Incompletas	NA	Vacina, EQT	Não	Não	242
----	---	----	-----	----------------	-------------	----	----------------	-----	-----	-----

As 45 amostras de melanoma oral canino e a amostra controle de tecido normal foram submetidas ao PCR quantitativo usando os primers CFA 9 (controle), CFA 10-1 (gene MDM2), CFA 10-2 (gene CDK4), CFA 30-1 (gene BUB-1) e CFA 30-2 (gene TRPM7), a curva de fusão (“melting curve”) das amostras de melanoma é comparada à curva de fusão padrão da amostra de tecido normal canino.

Todas as 45 amostras de melanoma oral tiveram mesmo ponto de fusão que a amostra controle para o CFA 30, tanto para o gene BUB-1 quanto para o gene TRPM7, encontram-se no mesmo quadrante entre 85,0 e 86,0°C e, portanto, não apresentaram mutação como mostrado na Figura 8.

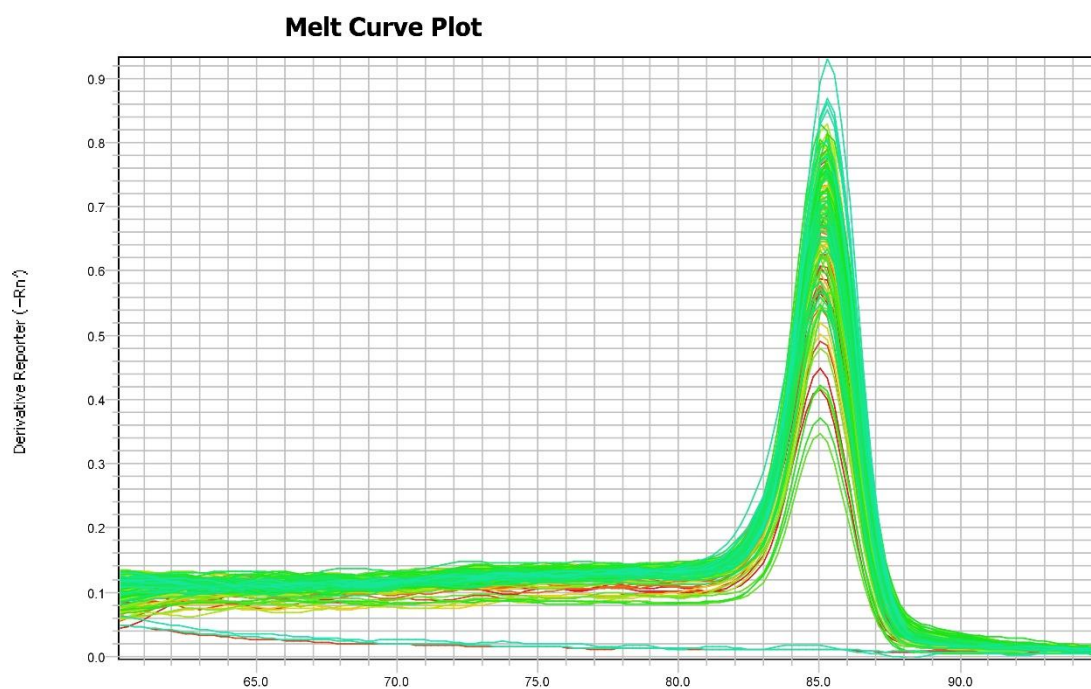


FIGURA 7: Curvas de fusão das amostras de melanoma oral canino em comparação com a amostra controle para CFA 30.

Já nas análises de curva de fusão para o cromossomo 10, quando avaliadas no gene MDM2, duas amostras apresentaram pontos de fusão diferentes da amostra controle e, portanto, apresentam mutação, são elas 1 e 38, a amostra controle apresentou ponto de fusão de 77,51°C e as amostras de

melanoma oral 1 e 38 apresentaram 78,28°C e 76,1°C respectivamente, confirmando a mutação como apresentado na Figura 9.

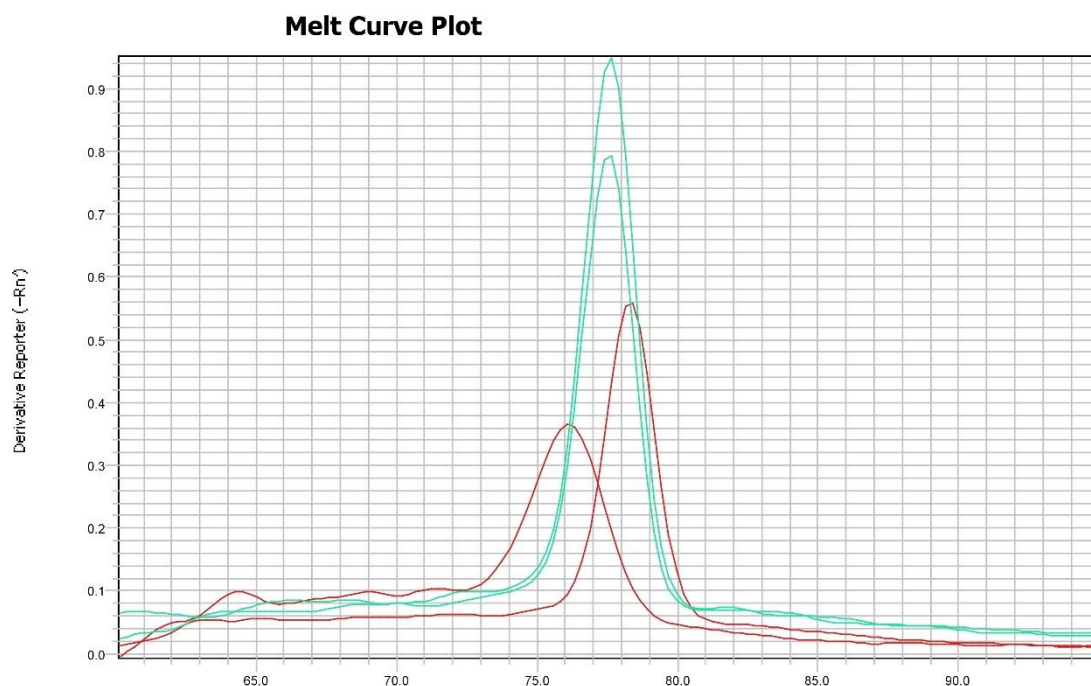


FIGURA 8: Amostras controle de tecido normal de cão representadas em verde e amostras de melanoma oral representadas em vermelho (amostras 38 e 1) para CFA 10 região do gene MDM2.

Nas análises de curva de fusão para o cromossomo 10 na região do gene CDK4 todas as 45 amostras de melanoma oral canino divergiram do ponto de fusão da amostra controle de tecido normal, sendo o ponto de fusão 81,1°C para a amostra controle e de 82,13°C para as amostras de melanoma oral confirmando a mutação como caracterizado na Figura 10.

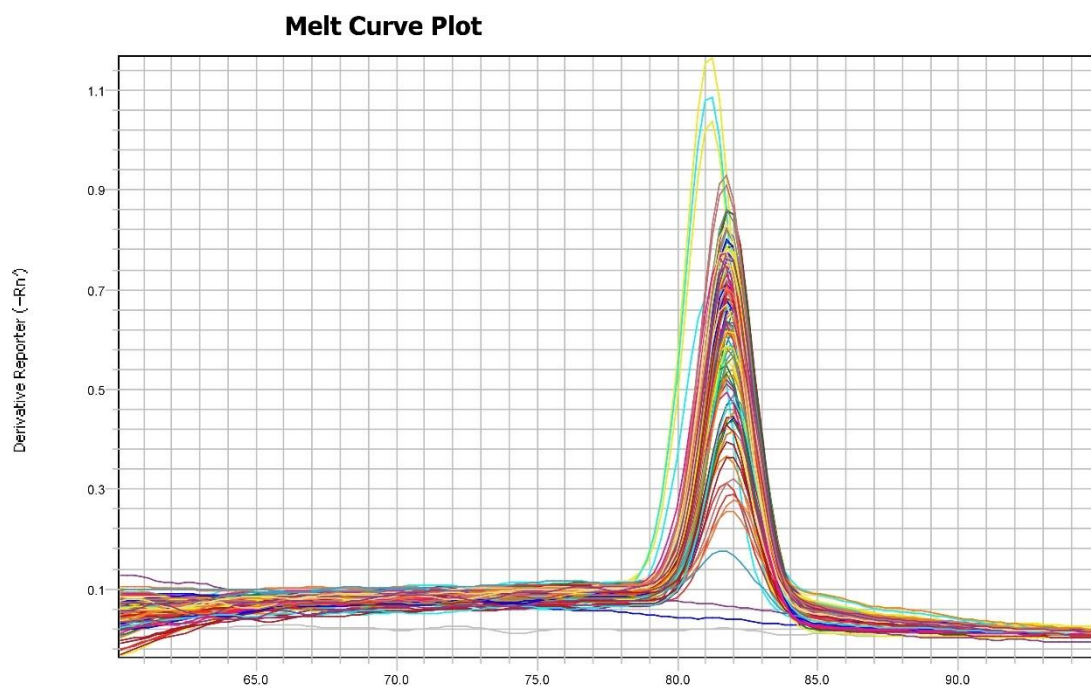


FIGURA 9: Amostras controle entre 81°C e 82°C e as amostras de melanoma oral entre 82°C e 83°C para CFA 10 região do gene CDK4.

Na Tabela 2 encontram-se as informações sobre grau de pigmentação e sobrevida global média dos 45 cães avaliados.

TABELA 2 – Avaliação histopatológica das amostras de melanoma oral canino (índice mitótico e grau de pigmentação) e Sobrevida Global:

AMOSTRAS	PIGMENTAÇÃO	SOBREVIDA (dias)
1	Leve (<50%)	91
2	Intensa (>50%)	95
3	Leve (<50%)	105
4	Leve (<50%)	73
5	Amelânico	157
6	Moderada (<50%)	36
7	Moderada (<50%)	507
8	Moderada (>50%)	101
9	Moderada (<50%)	32
10	Intensa (<50%)	130
11	Amelânico	217
12	Moderada	30
13	Moderada	112
14	Moderada	22
15	Moderada	352

16	Moderada	194
17	Intensa	31
18	Leve	29
19	Moderada	61
20	Amelânico	135
21	Moderada	112
22	Amelânico	907
23	Amelânico	183
24	Amelânico	56
25	Amelânico	38
26	Amelânico	26
27	Amelânico	33
28	Moderada	1040
29		61
30	Moderada	159
31	Moderada	141
32	Moderada	74
33	Amelânico	11
34	Amelânico	31
35	Moderada (<50%)	32
36	Moderada (<50%)	98
37	Leve (<50%)	33
38	Moderada (>50%)	30
39	Moderada (<50%)	90
40	Moderada (<50%)	30
41	Amelânico	180
42	Moderada (>50%)	60
43	Leve (<50%)	150
44	Amelânico	120
45	Moderada	242

Nas amostras 1 e 38 com mutação para o gene MDM2 no CFA 10, o índice mitótico, grau de pigmentação e sobrevida foram de 1 figura de mitose em 10 campos de 400x, pigmentação leve (<50%) e 91 dias, e 2 figuras de mitose em 10 campos de 400x, pigmentação moderada (<50%) e 30 dias, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Para as amostras de melanoma oral canino avaliadas neste estudo a prevalência racial predominante foi de cães sem raça definida, seguidos por Dachshunds, Cocker Spaniels, Poodles e Golden Retrievers, não houve predisposição sexual e os tumores acometeram principalmente cães idosos

acima de 10 anos, neste estudo com idade média de 12,6 anos, todas essas informações seguem literatura prévia descrita (RAMOS-VARA et al., 2000, DOBSON, 2013, GILLARD et al., 2014, PROUTEAU & ANDRÉ, 2019).

Do total de amostras, 11 apresentaram tumores com tamanho acima de 4 cm, e 24 apresentaram metástase em linfonodo regional enquadrando-se no estágio III definido pela OMS, enquanto 6 apresentaram metástase à distância no momento do diagnóstico enquadrando-se no estágio IV, como descrito em literatura (BERGMAN; SELMIC; KENT, 2020).

Dos 45 cães, 14 apresentaram recidiva local do melanoma oral mostrando o pior prognóstico deste tumor e dificuldade de margens completas mesmo fazendo um tratamento multimodal já que a maioria destes cães realizaram além da cirurgia vacina e/ou eletroquimioterapia como tratamento adjuvante.

Dos tratamentos utilizados, 29 cães fizeram cirurgia associada à eletroquimioterapia e vacina e obtiveram sobrevida média global de 169 dias, a maioria desses cães tiveram margens cirúrgicas incompletas. Apenas 1 cão fez somente cirurgia como tratamento e teve sobrevida global de 507 dias, estando dentro do que foi descrito em literatura, estudos de 346 e 874 dias (BOSTON et al., 2014, TUOHY et al., 2014). A sobrevida média global dos 45 cães foi de 140 dias [intervalo (22-1040)].

Os fatores prognósticos histopatológicos analisados nas amostras tumorais apresentaram 13 melanomas amelanóticos, 6 melanomas com pigmentação leve, 13 com pigmentação moderada e 3 com pigmentação intensa.

No desenvolvimento desse estudo, a primeira dificuldade observada foi relacionada à não amplificação dos *primers* descritos na literatura para o cromossomo CFA 30. Quando utilizados os *primers* previamente publicados (PROUTEAU et al., 2020), houve uma amplificação tardia na curva de fusão, não permitindo avaliação da amplificação gênica. Com isso, para avaliação das amplificações do CFA 30, foi necessário desenhar novos *primers* para as regiões desejadas, genes BUB-1 e TRPM7. Ao realizar com os *primers* descritos em literatura obteve-se uma amplificação tardia sem uma curva de fusão correta, levando a necessidade de redesenhá-los e ampliar a sequência de nucleotídeos da região a ser avaliada para que obtivesse uma amplificação correta. O mesmo foi necessário para o CFA 10 nas regiões dos genes MDM2 e CDK4.

Após padronização do PCR quantitativo, o próximo desafio foi a não existência da mutação nos melanomas orais do grupo amostral para o CFA 30, o que difere dos dados previamente publicados (PROUTEAU et al., 2020). A literatura prévia indica que a frequência de mutações no cromossomo CFA 30 é de aproximadamente 50,7%. No entanto, sem a existência da mutação nas amostras deste estudo esse marcador deixa de ter uma relevância na rotina clínica.

Para as regiões dos genes escolhidos do CFA 10, nos resultados de PCR quantitativo o gene MDM2 foi amplificado em 2/45 tumores (4,44%), em literatura prévia a prevalência foi de 49,3% e o gene CDK4 foi amplificado em 45/45 tumores (100%), em literatura anterior foi de 41,1% (PROUTEAU et al., 2020). Foi enviado para sequenciamento genético a amostra controle de tecido normal canino, as duas amostras com mutação em MDM2 e duas amostras de melanomas amelanóticos com mutação em CDK4 para comparar os resultados.

Devido a baixa frequência da mutação para o gene MDM2, responsável por bloquear o supressor tumoral p53, não foi possível avaliar correlação com fatores prognósticos clínicos e patológicos e, portanto, não há relevância na rotina clínica. A alta prevalência da mutação no gene CDK4, envolvido na fase inicial do ciclo celular, mostra superexpressão nos melanomas orais caninos, porém sem correlação específica com os fatores prognósticos.

Dentre as possibilidades discutidas para a diferença de presença de amplificações focais no CFA 30 das amostras de melanoma oral canino testadas para estudos anteriores, considerou-se o fator geográfico e possível interferência ambiental e genética na mutação de melanomas orais caninos brasileiros já que demais estudos foram realizados em países europeus.

Foi realizado contato com o autor do estudo anterior a este, *Prouteau et al.*, que irá contribuir gentilmente enviando amostras de melanomas orais caninos com mutação nos genes aqui estudados para que possa ser feita uma comparação.

Além disso, em estudo recente *Brocca et al.* observou ganho de cromossomo inteiro em 37% das amostras de melanoma oral canino para o CFA 13 e perda de cromossomo inteiro em 25% das amostras para o CFA 22, abrindo outras possibilidades de avaliação para estudo.

5. CONCLUSÃO

Neste presente estudo não foi encontrada amplificação focal em CFA 30 para melanomas orais caninos como descritos anteriormente em literatura, com isso, não foi possível associar com prognóstico. A incidência de amplificação focal para MDM2 em CFA 10 foi muito baixa e a incidência de amplificação focal para CDK4 foi de 100%, não demonstrando especificidade para valor prognóstico nos melanomas orais avaliados também nestas regiões. Novos estudos serão necessários para definir padrões de amplificação focal em regiões cromossômicas nos melanomas orais caninos brasileiros, para definição de valor prognóstico e novos alvos terapêuticos na rotina clínica destes tumores.

6. REFERÊNCIAS

ALMELA, Ramón M.; ANSÓN, Agustina. A review of immunotherapeutic strategies in canine malignant melanoma. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 1, p. 15, 2019.

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

BERGMAN, Philip J; SELMIC, Laura e; KENT, Michael s. Melanoma. In: VAIL, David M; THAMM, Douglas H; LIPTAK, Julius M. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. 6. ed. St. Louis: Elsevier, 2020. Cap. 20. p. 367-381.

BORIA, Pedro A. et al. Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 3, p. 388-394, 2004.

BOSTON, Sarah E. et al. Efficacy of systemic adjuvant therapies administered to dogs after excision of oral malignant melanomas: 151 cases (2001–2012). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 245, n. 4, p. 401-407, 2014.

BROCCA, Ginevra et al. Array comparative genomic hybridization analysis reveals significantly enriched pathways in canine oral melanoma. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1397, 2019.

CAVALLO, Federica et al. Xenogene vaccination in the therapy of cancer. **Expert opinion on biological therapy**, v. 14, n. 10, p. 1427-1442, 2014.

CUNHA, Simone Carvalho dos Santos et al. Radiation therapy for oral melanoma in dogs: A retrospective study. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

DOBSON, Jane M. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

FREEMAN, Kim P. et al. Treatment of dogs with oral melanoma by hypofractionated radiation therapy and platinum-based chemotherapy (1987–1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2003.

FONSECA-ALVES, Carlos Eduardo et al. Current status of canine melanoma diagnosis and therapy: report from a colloquium on canine melanoma organized by ABROVET (brazilian association of veterinary oncology). **Frontiers in Veterinary Science**, p. 913, 2021.

FOURNIER, Quentin et al. Investigation of the utility of lymph node fine-needle aspiration cytology for the staging of malignant solid tumors in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, p. 489-500, 2018.

FOWLES, J. S.; DENTON, C. L.; GUSTAFSON, D. L. Comparative analysis of MAPK and PI3K/AKT pathway activation and inhibition in human and canine melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 13, n. 3, p. 288-304, 2015.

GARCIA, Jéssica Soares et al. Association of systemic inflammatory and immune indices with survival in canine patients with oral melanoma, treated with

experimental immunotherapy alone or experimental immunotherapy plus metronomic chemotherapy. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2022.

GILLARD, Marc 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.

GYORFFY, Steve et al. Bone marrow-derived dendritic cell vaccination of dogs with naturally occurring melanoma by using human gp100 antigen. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 19, n. 1, p. 56-63, 2005.

HARDWICK, Laura. A Comparative View on Molecular Alterations and Potential Therapeutic Strategies for Canine Oral Melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 11, p. 286, 2021.

HAWKINS, Steve FC; GUEST, Paul C. Multiplex analyses using real-time quantitative PCR. **Multiplex Biomarker Techniques: Methods and Applications**, p. 125-133, 2017.

HENDRICKS, William PD et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. **PLoS genetics**, v. 14, n. 9, p. e1007589, 2018.

HITTE, Christophe et al. Genome-wide analysis of long non-coding RNA profiles in canine oral melanomas. **Genes**, v. 10, n. 6, p. 477, 2019.

IUSSICH, Selina et al. PDGFRs expression in dogs affected by malignant oral melanomas: correlation with prognosis. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 2, p. 462-469, 2017.

KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

LADUE, Tracy A. et al. Factors influencing survival after radiotherapy of nasal tumors in 130 dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 40, n. 3, p. 312-317, 1999.

LYU, Jiong et al. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. **The Journal of Pathology**, v. 244, n. 3, p. 358-366, 2018.

MAEKAWA, Naoya et al. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

MELLMAN, Ira; COUKOS, George; DRANOFF, Glenn. Cancer immunotherapy comes of age. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 480-489, 2011.

NISHIYA, Adriana Tomoko et al. Comparative aspects of canine melanoma. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

PALMA, Stefano Di et al. Review on canine oral melanoma: an undervalued authentic genetic model of human oral melanoma?. **Veterinary Pathology**, v. 58, n. 5, p. 881-889, 2021.

PAZZI, Paolo; STEENKAMP, Gerhard; RIXON, Anouska J. Treatment of Canine Oral Melanomas: A Critical Review of the Literature. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 5, p. 196, 2022.

PEREIRA, Ethel R. et al. Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice. **Science**, v. 359, n. 6382, p. 1403-1407, 2018.

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

PROUTEAU, Anais; ANDRÉ, Catherine. Canine melanomas as models for human melanomas: Clinical, histological, and genetic comparison. **Genes**, v. 10, n. 7, p. 501, 2019.

PROUTEAU, Anais et al. Prognostic value of somatic focal amplifications on chromosome 30 in canine oral melanoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 18, n. 2, p. 214-223, 2020.

PROUTEAU, Anais et al. Canine oral melanoma genomic and transcriptomic study defines two molecular subgroups with different therapeutical targets. **Cancers**, v. 14, n. 2, p. 276, 2022.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 6, p. 597-608, 2000.

RUSSO, Alessia E. et al. Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies. **International journal of oncology**, v. 34, n. 6, p. 1481-1489, 2009.

SANBORN, J. Zachary et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 35, p. 10995-11000, 2015.

SMEDLEY, R. C. et al. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 54-72, 2011.

SMEDLEY, Rebecca C. et al. Diagnosis and Histopathologic Prognostication of Canine Melanocytic Neoplasms: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. **Veterinary and Comparative Oncology**, 2022.

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.

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

SPUGNINI, Enrico P. et al. Local control and distant metastasis after electrochemotherapy of a canine anal melanoma. **in vivo**, v. 21, n. 5, p. 897-899, 2007.

SPUGNINI, Enrico Pierluigi; BALDI, Alfonso. Electrochemotherapy in veterinary oncology: state-of-the-art and perspectives. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 5, p. 967-979, 2019.

TAYLOR, Sean C. et al. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 761-774, 2019.

TELLADO, Matías Nicolás et al. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. **Radiology and oncology**, v. 54, n. 1, p. 68-78, 2020.

THAMM, Douglas H. et al. RT-PCR-based tyrosine kinase display profiling of canine melanoma: IGF-1 receptor as a potential therapeutic target. **Melanoma research**, v. 20, n. 1, p. 35-42, 2010.

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

VON EULER, Henrik et al. Efficient adenovector CD40 ligand immunotherapy of canine malignant melanoma. **Journal of Immunotherapy**, v. 31, n. 4, p. 377-384, 2008.

WADE, Mark et al. Hdmx modulates the outcome of p53 activation in human tumor cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 44, p. 33036-33044, 2006.

WILHELM, Jochen; PINGOUD, Alfred. Real-time polymerase chain reaction. **Chembiochem**, v. 4, n. 11, p. 1120-1128, 2003.

WILLIAMS, Laurel E.; PACKER, Rebecca A. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 9, p. 1234-1236, 2003.

WONG, Kim et al. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2019.

ZAMBONI, Clarissa et al. Cyclin D1 immunohistochemical expression and somatic mutations in canine oral melanoma. **Veterinary and comparative oncology**, v. 18, n. 2, p. 231-238, 2020.