

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**APLICAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS
NUCLEARES E EPIGENÉTICOS NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES MELANOCÍTICOS
CUTÂNEOS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

VIVIANE MARQUES DE OLIVEIRA

SÃO PAULO

2022

UNIVERSIDADE PAULISTA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PATOLOGIA
AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**APLICAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS
NUCLEARES E EPIGENÉTICOS NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES MELANOCÍTICOS
CUTÂNEOS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

VIVIANE MARQUES DE OLIVEIRA

SÃO PAULO

2022

Oliveira, Viviane Marques de.

Aplicação de parâmetros morfológicos nucleares e epigenéticos no diagnóstico diferencial de tumores melanocíticos cutâneos em cães / Viviane Marques de Oliveira. - 2022.

23 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Patologia Integrada e Translacional.

Orientador: Prof. Dr. José Guilherme Xavier.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Silva

1. Morfometria. 2. Melanoma. 3. Melanocitoma. 4. LINE-1.
5. Hipometilação. I. Xavier, José Guilherme (orientador). II. Silva, Rodrigo Augusto (coorientador). III. Título.

VIVIANE MARQUES DE OLIVEIRA

**APLICAÇÃO DE PARÂMETROS MORFOLÓGICOS
NUCLEARES E EPIGENÉTICOS NO DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DE TUMORES MELANOCÍTIOS
CUTÂNEOS EM CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Guilherme Xavier
Universidade Paulista – UNIP

Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Beatriz de Bem Kerr Martins

Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

Prof.^a Dr.^a Eliana Reiko Matushima
Universidade de São Paulo – USP

PREFÁCIO

Este volume refere-se à Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre apresentada à banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista.

De acordo com as normas do Programa, esta Dissertação é apresentada na forma de artigo científico de autoria do aluno e organizada de acordo com as exigências do veículo de publicação científica escolhido.

O periódico escolhido para submissão foi a *Pesquisa Veterinária Brasileira*, sob o título Aplicação de parâmetros morfológicos nucleares e epigêneticos no diagnóstico diferencial de tumores melanocíticos cutâneos em cães.

Título: Aplicação de parâmetros morfológicos nucleares e epigêneticos no diagnóstico diferencial de tumores melanocíticos cutâneos em cães.

Autores: Oliveira, V.M.; Ruffino, C.C.; Aquino, N.P.; Alves, C.S.; Silva, R.A.; Xavier, J.G.

DEDICATÓRIA

Agradeço primeiramente a Deus em que meu deu a dádiva da vida e proporcionou oportunidades, fé, força e esperança;

Aos meus filhos Natália e Gabriel, por ter feito parte dessa trajetória, por entender algumas ausências e por me ensinar o verdadeiro amor;

Ao meu esposo Cristiano, pelo incentivo e companheirismo;

A minha mãe Isabel, por estar presente, por me ensinar sobre a perseverança e dedicação;

Aos professores do programa de Patologia, pelos seus ensinamentos;

Em especial ao professor Dr. José Guilherme Xavier pela sua paciência, compreensão, apontamentos, direcionamento e orientação para a realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Rodrigo, pela sua contribuição e orientação;

Aos meus amigos Fernanda e Mario, e sua filhinha Valentina, por estarem juntos em todos os momentos e etapas importantes, com o seu apoio e palavras de incentivo;

Aos meus colegas do programa pelos momentos de estudo, seminários e experimentos;

E a equipe da secretaria da universidade, por todo o apoio.

Aplicação de parâmetros morfológicos nucleares e epigenéticos no diagnóstico diferencial de tumores melanocíticos cutâneos em cães

Viviane Marques de Oliveira¹; Caroline Cellero Ruffino²; Nathália Piotto de Aquino² ;
Camila Sabaudó Alves¹ ; Rodrigo A. Silva¹; José Guilherme Xavier¹.

ABSTRACT Oliveira, V.M.; Ruffino, C.C.; Aquino, N.P.; Alves, C.S.; Silva, R.A.; Xavier, J.G. 2022. **Application of epigenetic and morphological nuclear parameters in the differential diagnosis of cutaneous melanocytic tumors in dogs.** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2022. Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, Universidade Paulista – UNIP-Medicina Veterinária-Iniciação Científica- Rua Doutor Bacelar, 1212-Vila Clementino, São Paulo- SP, CEP: 04026-002, Brasil E-mail: mv.vmoliveira46@gmail.com.

Melanocytic proliferative lesions follow different species of animals, showing potential for studies in comparative pathology. Benign (melanocytoma) and malignant (melanoma) cutaneous melanocytic neoplasms suggest great variation between cells, making it difficult for the pathologist to differentiate and distinguish them. In the current studies, morphometric and molecular tools were implemented in the search for additional distinctive indicators between the two conditions, related to nuclear morphological characteristics and epigenetic alterations in the neoplastic population. Eighteen samples were obtained of dogs with cutaneous melanocytic lesions, these were embedded in paraffin and diagnosed with histopathology. To distinguish the differences between them and to evaluate the methylation pattern of the LINE-1 element, morphological guidelines such as nucleolar frequency, nuclear score and morphometry, and epigenetics were used. The results related to nucleolar frequency, nuclear score and nuclear guideline showed a significant difference statistically between benign and malignant samples. The hypomethylation of the LINE-1 transposition element has been highlighted as a biomarker, useful for understanding molecular bases, early detection and prognostic information in human cancers, including melanocytic cancers. There was a significant difference between the groups with the 5-meC/5-hmeC ratio, with hypermethylation in melanomas. To summarize, the results indicate the possibility of using these guidelines to distinguish between the diagnosis of cutaneous melanocytic lesions in dogs.

Index-Terms: morphometry, melanoma, melanocytoma, LINE-1, hypomethylation.

RESUMO As lesões proliferativas melanocíticas acompanham diferentes espécies de animais, apresentando potencial em estudo na patologia comparada. As neoplasias melanocíticas cutâneas benignas (melanocitoma) e malignas (melanoma) apresentam grande variação entre as células, dificultando a diferenciação e distinção para o patologista. Neste presente estudo foram empregadas ferramentas morfométricas e moleculares na busca por parâmetros distintivos adicionais entre as duas condições, relacionados às características morfológicas nucleares e as alterações epigenéticas na população neoplásica. Foram obtidas 18 amostras de lesões melanocíticas cutâneas de cães, emblocadas em parafina e diagnosticadas histopatologicamente. Para a diferenciação entre elas foram utilizados parâmetros morfológicos como frequência nucleolar, escore e morfometria nucleares, e epigenéticos, avaliando-se o padrão de metilação do elemento LINE-1. Os resultados relativos à frequência nucleolar, ao escore nuclear e ao perímetro nuclear evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre as amostras benignas e malignas. A hipometilação do elemento de transposição LINE-1 tem se destacado como biomarcador, útil para a compreensão de bases moleculares, detecção precoce e informação prognóstica em cânceres humanos, entre eles os melanocíticos. Houve diferença significativa na razão entre 5-meC/5-hmeC entre os grupos, com hipermetilação em melanomas. Em síntese, os resultados indicam a possibilidade de utilização destes parâmetros para o diagnóstico diferencial entre as lesões melanocíticas cutâneas em cães.

Termos de Indexação: Morfometria, Melanoma, Melanocitoma, LINE-1, Hipometilação.

INTRODUÇÃO

A oncologia veterinária é uma área em crescimento devido ao aumento na casuística de lesões oncológicas em animais de companhia, demandando maior incremento nas investigações relacionado à biologia e diagnóstico de processos neoplásicos (Rosenthal, 2004).

As lesões proliferativas melanocíticas acompanham diferentes espécies animais, apresentando potencial para estudos em patologia comparada, estando relacionadas, como as demais neoplasias, à alterações genéticas e epigenéticas (Hanahan & Weinberg, 2011). Em consonância com o sistema classificatório revisado da OMS (Goldschmidt et al., 1998), empregaremos o termo melanocitoma para referir os processos proliferativos benignos e melanoma para as lesões malignas derivadas de melanócitos.

Os melanócitos são células dendríticas, encontradas intercaladas com as células basais da epiderme e do bulbo piloso, derivando de uma população germinativa de melanoblastos, de origem neuroectodérmica (Goldschmidt, 2002). Durante a vida fetal, melanoblastos migram da crista neural para os bulbos pilosos, maturando em melanócitos. Alguns param na derme, e constituem a população de melanócitos dérmicos, enquanto outros alcançam a epiderme. Assim, expansões melanocíticas cutâneas podem derivar da derme, de anexos ou da epiderme (Gross et al., 2005).

Alguns autores propõem o emprego do melanoma canino como um modelo para a compreensão do melanoma na espécie humana (Simpson et al., 2014), particularmente naqueles independentes da ação da radiação ultra-violeta, como os melanomas acrais e de mucosas (Yasumaru, 2019).

Nos cães, as neoplasias melanocíticas compreendem entre 4 e 6% dos tumores cutâneos com o predomínio das lesões benignas (Smith et al., 2002; Conroy, 1983; Pulley & Stannard, 1990; Goldschmidt & Shofer, 1992; Goldschmidt & Hendrick, 2002). Em termos gerais, os locais mais acometidos são a cavidade oral (56%), pele (19%) e olhos (2%) (Dias, 2013; Smith et al., 2002).

A localização anatômica sugere como um fator prognóstico significativo, mas não preditivo. Sendo assim, o melanoma em cavidade oral é considerado mais agressivo e de pior prognóstico, comparados a neoplasmas localizados em pele, porém quando em dígitos tem o pior prognóstico. Sexo, raça e idade, parecem não ter influência no comportamento biológico tumoral (Bergman et al., 2013; Smedley, 2011). O estadiamento consiste na classificação clínica TNM para o melanoma cutâneo, considerando tamanho, presença de metástases em linfonodos regionais e distantes (Bergman et al., 2013). São afetados cães entre 3 e 15 anos de idade, com maior ocorrência em animais entre 9 e 13 anos (Bostok, 1979; Modiano et al., 1999; Smith et al., 2002). Embora não haja predisposição de gênero, existem relatos indicando maior risco associado a cães de raças pequenas, como o scottish terrier, poodle toy, schnauzer miniatura e standard, cocker spaniel, chow-chow, setter gordon e irlandês, golden retriever e dobermann pinscher (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Ramos-Vara et al., 2000).

O diagnóstico depende da avaliação citológica e/ou histopatológica a partir de amostras realizadas por biópsia incisional ou excisional. Para a distinção entre benignidade e malignidade em neoplasias melanocíticas são utilizados alguns critérios histológicos como: atipia nuclear, nível de infiltração, presença de necrose e, em especial, o índice mitótico (Smedley et al., 2011; Spangler & Kass, 2006).

Lindholm & Hofer (1986) referiram grande heterogeneidade celular em lesões proliferativas melanocíticas cutâneas, benignas e malignas em humanos, dificultando a diferenciação entre os processos. No entanto, Donizy et al. (2017) evidenciaram, em melanomas cutâneos humanos, pior prognóstico associado a menor tempo livre de doença e sobrevida em lesões dotadas de nucléolos mais frequentes e em maior número, revigorando o interesse por abordagens morfológicas.

Ainda em termos morfológicos, características morfométricas nucleares têm sido úteis na distinção, principalmente, entre lesões epiteliais benignas e malignas, em diferentes tecidos como estômago, intestino, córtex adrenal, próstata, e urotélio humanos (Poropatch et al., 2016; Diaz-Cano et al., 1993; Jarvis; Whitehead, 1975), mas também em lesões mesenquimais, como nos mastocitomas caninos (Strefezzi et al., 2003).

Ainda no sentido de ampliar o conhecimento e a compreensão das neoplasias melanocíticas, a abordagem de eventos epigenéticos potencialmente pode complementar a

caracterização do caráter da lesão. A epigenética se caracteriza por modificações herdáveis na expressão gênica e que não alteram as sequências das bases do DNA (Deans e Maggert, 2015; Tollefsbol, 2017). Essas modificações são feitas e desfeitas regularmente, e estes mecanismos epigenéticos controlam as modificações (Feinberg, 2001; Rodrigues et al., 2019). A metilação do DNA está relacionada à adição do grupo metila ao 5-C (quinto carbono) da citosina de um dinucleotídeo CpG, sendo fundamental para o desenvolvimento normal das células e a estabilidade gênica (Melo, 2015). A hipermetilação está associada à inativação de genes supressores tumorais e a hipometilação aponta para a instabilidade cromossômica e ativação de proto-oncogenes, antes silenciados, porém agora ativados, estimulando a proliferação celular (Venza et al., 2010; Wu & Sun, 2006). Segundo Molognoni et al. (2011), a metilação do DNA tem um papel importante no processo de transformação dos melanócitos. Em humanos, cerca de 17 % do genoma é abundante com sequências repetitivas e intercaladas originadas de retrotransposons como a LINE-1 (L1) (Furano, 2000). Essas L1 ativas utilizam um mecanismo de “copiar e colar”, para se inserir no genoma, por meio do RNA remodelando o genoma individual, podendo tornar-se uma fonte de mutagênese, como no câncer, perpetuando um papel importante na instabilidade do genoma (Feinberg, 2004). O padrão de metilação de LINE-1 no sangue periférico tem sido associado ao risco de câncer, diferindo em diferentes tipos de câncer em humanos. A hipometilação do DNA no sangue periférico tem sido sugerida como um biomarcador para risco de câncer (Friso, 2013). Estudos em lesões melanocíticas humanas sugerem a ocorrência de alterações epigenéticas, inclusive relativas à metilação do elemento LINE-1 aspecto ainda pouco explorado em lesões análogas caninas.

Nesse estudo, são investigados aspectos morfológicos nucleares e cariométricos nas células neoplásicas de melanocitomas e de melanomas cutâneos caninos, além do padrão de metilação do elemento LINE-1, avaliando-se a relevância dessas análises no diagnóstico diferencial dessas condições.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras. Foram avaliadas, 18 lesões melanocíticas cutâneas provenientes de cães, machos e fêmeas, previamente diagnosticadas como melanocitomas e melanomas, a partir dos arquivos do Laboratório Rous Patologia Animal Ltda.

Classificação histopatológica. Cortes histológicos de aproximadamente 5µm corados pelo método de hematoxilina- eosina foram classificados de acordo com critérios estabelecidos em literatura (Ramos-Vara et al., 2000; Smith et al., 2002; Spangler e Kass, 2006).

Índice mitótico. Obtido a partir da contagem de mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA), utilizando a objetiva de 40x.

Frequência nucleolar. Foi avaliada a presença de nucléolos nas células neoplásicas. A frequência nucleolar foi obtida a partir da pesquisa da presença de nucléolo em 200 células neoplásicas, sendo avaliados 04 campos de grande aumento (40x) por formação, em áreas de maior pleomorfismo (“hot spots”). O resultado foi expresso em percentual de ocorrência.

Escore nuclear. O escore nuclear foi obtido de modo semiquantitativo, usando uma escala de graduação a partir da investigação de atipia nuclear em 100 células neoplásicas, em objetiva de 40x, gerando um escore numérico (de 0 a 10) correspondendo ao percentual de células com atipia nuclear:

0. Ausência de núcleos atípicos;
1. De 1 a 9% de núcleos atípicos;
2. De 10 a 19% de núcleos atípicos;
10. De 90 a 100% dos núcleos atípicos.

Para fins práticos, os escores foram agrupados em: de 0 a 3 (leve), de 4 a 8 (moderado) e 9 a 10 (severo).

Morfometria nuclear. Os cortes teciduais foram analisados em microscópio óptico, a partir dos quais foram obtidas imagens digitalizadas, capturadas pelo fotomicroscópio OPTICAM®, a partir de 4 campos de grande aumento (40x) por formação, em áreas de maior pleomorfismo (“hot spots”). Em cada um dos campos foram mensuradas 50 células neoplásicas, a partir da delimitação manual de seu núcleo, com o auxílio do cursor. Com o emprego do software Metamorph®, foi procedida a avaliação morfométrica considerando-se o perímetro nuclear, expresso em pixels (Strefezzi et al, 2003).

Avaliação Epigenética

Extração do DNA genômico. Para obtenção do DNA genômico (gDNA), cortes histológicos fragmentados foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5 % SDS). Para extração do gDNA, as amostras foram inicialmente digeridas com proteinase K (20 mg/mL) por 16 horas a 56°C. No dia seguinte foi adicionado 0,5 mL de fenol-clorofórmio equilibrado (pH 8,0) e homogeneizados manualmente até a formação de uma emulsão leitosa. Em seguida as amostras foram centrifugadas (15 minutos a 14.000 rpm) a temperatura ambiente. Após o término da centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo. Após este procedimento, foram adicionados 500 µL de clorofórmio e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas (15 minutos a 14.000 rpm), o sobrenadante coletado e foram adicionados 1 ml de álcool 100% gelado e 150 µL de acetato de sódio 3M. Após incubação (2 horas a - 70°C) o gDNA foi precipitado por centrifugação (15 minutos a 14000 rpm). Após a lavagem do etanol 70% gelado em água DEPC estéril, o gDNA foi ressuscitado em 50 µL de água DEPC estéril. A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Tratamento enzimático do DNA. Para determinação do conteúdo de 5-metilcitosina (5-meC) e 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37 °C por 2 h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4-β- glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μL. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5- hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5- hidroximetilcitosina, o qual bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas e não metiladas, mantendo íntegras as regiões CCGG hidroximetiladas. Em etapa seguinte, as amostras foram incubadas a 65 °C por 15 min para inativação da enzima T4-BGT (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). Após o tratamento com a enzima T4-BGT os tubos foram digeridos com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequências CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas promovem a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100 %). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μL a 37°C por 2 horas.

Determinação do padrão global de metilação. O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora do elemento LINE-1 foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (5 μL) 0,5 nM de iniciadores específicos [F (3'-GCG CGC AGT TGC TGT TAC TGT 5'); R (3'-GCT CCA GGG AGT TGG AGC AG 5')] (Lee et al., 2019), 1 μL (16 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições: H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>). A obtenção dos valores percentuais referentes à metilação e hidroximetilação foram calculados de acordo com Nestor et al. (2012).

Análise estatística. Os parâmetros morfológicos nucleares (frequência nucleolar, escore nuclear), e morfométricos, perímetro nuclear, foram avaliados estatisticamente com o emprego do software Graphpad Prism9®, utilizando-se o teste t de Student, não pareado, sendo o nível de p<0,05 considerado estatisticamente significante.

RESULTADOS

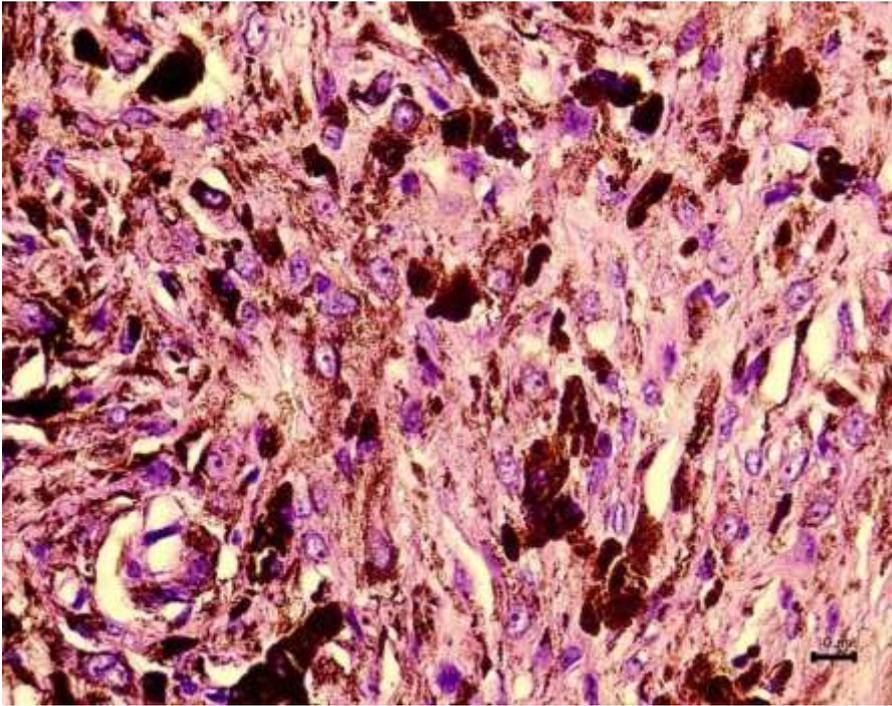
Foram avaliadas lesões provenientes de 8 fêmeas e 10 machos. No Quadro 1 estão relacionadas as amostras cutâneas representadas, com a caracterização de raça, gênero, idade, localização, diagnóstico, índice mitótico, escore nuclear e frequência nucleolar. As amostras foram obtidas a partir de arquivos do Laboratório Rous Patologia Animal Ltda, diagnosticadas histopatologicamente, a partir de cortes corados pela hematoxilina/eosina (HE).

Quadro 1. Lesões melanocíticas cutâneas caninas avaliadas, considerando raça, gênero, idade, localização, diagnóstico, índice mitótico(IM), escore nuclear (EN) e frequência de nucléolos (Nolo).

Registro	Raça	Gênero	Idade	Local	Diagnóstico	IM	EN	Nolo
122012006B	labrador	F	9	axila	melanocitoma	0	1	46
103022002	staffordshire	M	7	escapula	melanocitoma	0	2	26
103062003	SRD	F	6	perianal	melanocitoma	1	2	14
115072010	schnauzer	M	10	focinho	melanocitoma	0	2	42
103122004	SRD	M	10	perianal	melanocitoma	2	2	19
111122011	pointer	F	9	pele	melanocitoma	1	1	38
123122016B	SRD	F	13	periocular	melanocitoma	1	3	28
104012105	rottweiler	F	11	MAE	melanocitoma	1	3	24
109032005	SRD	F	11	perianal	melanoma	11	5	74
101042002	SRD	M	8	falange	melanoma	9	3	67
111042002	SRD	F	16	abdomen	melanoma	9	5	75
104062007	SRD	M	14	MPD	melanoma	8	3	28
110062001	SRD	M	11	MPE	melanoma	9	3	24
119082009	SRD	M	10	prepúcio	melanoma	15	4	39
116092004	SRD	M	10	MPE	melanoma	16	3	51
109122003B	rottweiler	F	9	perianal	melanoma	9	2	51
123012101	schnauzer	M	14	prepúcio	melanoma	11	7	59
103022103	SRD	M	12	abdomen	melanoma	18	4	48

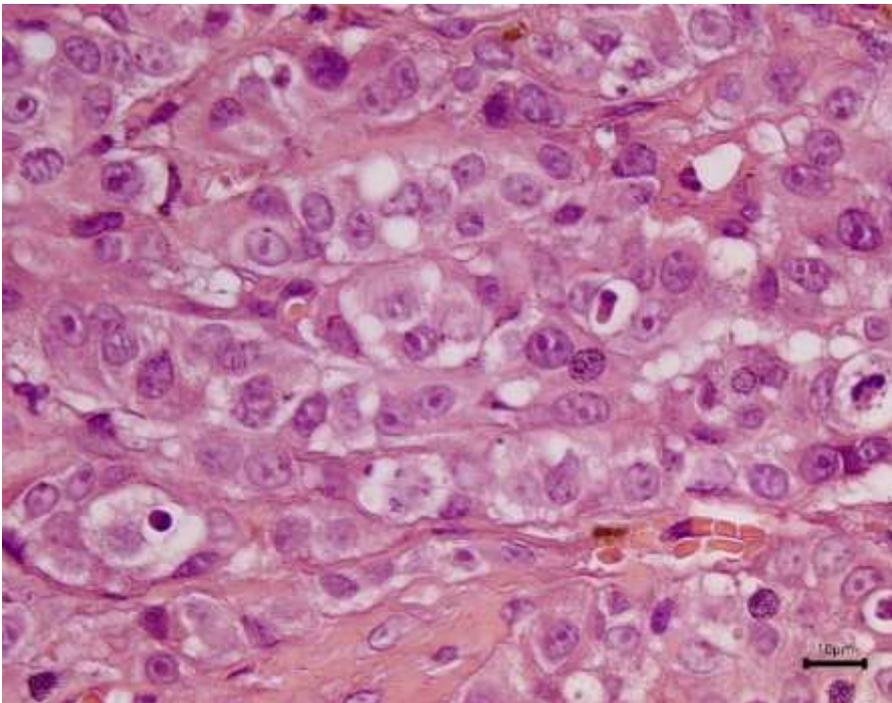
Fonte: Xavier, J G.; 2021

Das amostras analisadas, 61% foram provenientes de cães SRD, sendo diagnosticados histopatologicamente como 3 melanocitomas e 8 melanomas. Considerando-se os cães de raça, predominaram os schnauzers e rottweilers, com 2 amostras de cada. As formações foram provenientes de diferentes regiões corpóreas, predominando território troncular e membros. A idade média de acometimento foi de 9,4 anos para os melanocitomas e 11,5 anos para os melanomas. Nos primeiros foi frequente a pigmentação, com frequente obscurecimento das estruturas nucleares. De maneira geral as células exibiram maior homogeneidade morfológica, como núcleos ovalados e cromatina frouxa (figura 1). Já nos melanomas as características de anaplasia foram mais intensas, envolvendo aumento de relação núcleo/citoplasma, anisocariose, macronúcleolos, incremento mitótico e eventual ausência de pigmentação (figura 2).



Fonte: Xavier, J G.; 2021

Figura 1. Fotomicrografia de corte histológico de melanocitoma cutâneo canino, exibindo homogeneidade celular, com o predomínio de células pequenas, amíúde pigmentadas, com frequente obscurecimento nuclear. Cromatina frouxa, nucléolos indistintos. H/E.



Fonte: Xavier, J G.; 2021

Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de melanoma cutâneo evidenciando a presença de população neoplásica organizada em ninhos, com anisocariose, nucléolos evidentes e frequentemente múltiplos. H/E.

A caracterização nuclear envolveu o emprego de avaliação morfológica convencional e de ferramenta morfométrica. Os resultados foram submetidos à avaliação estatística, com o emprego do teste T de Student, não-pareado (figuras 3 a 5).

Quanto à frequência nucleolar nas amostras, expressa em percentual, obtivemos, em melanocitomas $29,03 \pm 4$ e em melanomas $55,8 \pm 4,14$, sendo caracterizada diferença estatisticamente significativa com $p < 0,004$, a partir do teste T de Student não pareado (figura 4).

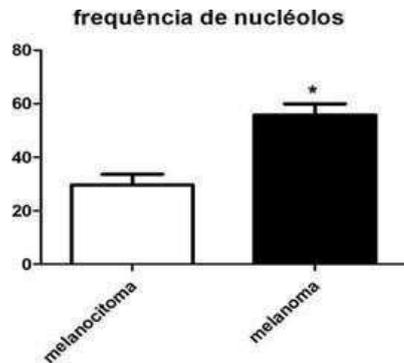


Figura 4. Gráfico apresentando a frequência nucleolar, em percentual, nas células de melanocitomas e melanomas, com diferença estatisticamente significativa, $p < 0,004$, teste T de Student não-pareado.

Em relação ao escore nuclear, um indicador de atipia nuclear, os melanocitomas apresentaram o valor médio de $2,0 \pm 0,27$, enquanto os melanomas $4,0 \pm 0,49$, sendo caracterizada diferença estatisticamente significativa, a partir do teste T de Student não pareado, com $p < 0,004$ (figura 3).

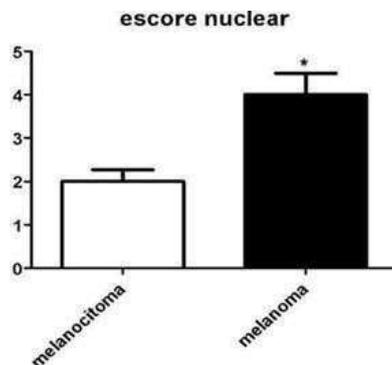


Figura 3. Gráfico apresentando o escore nuclear, em melanocitomas e melanomas cutâneos, com diferença estatisticamente significativa, $p < 0,004$, teste T de Student não-pareado.

A partir da avaliação morfométrica, foi mensurado o perímetro nuclear (em pixels), com o valor médio de 182918 ± 1712 e 207914 ± 6667 , respectivamente, em melanocitomas e melanomas, sendo caracterizada diferença estatisticamente significativa com $p < 0,0001$, a partir do teste T de Student não pareado (figura 5).

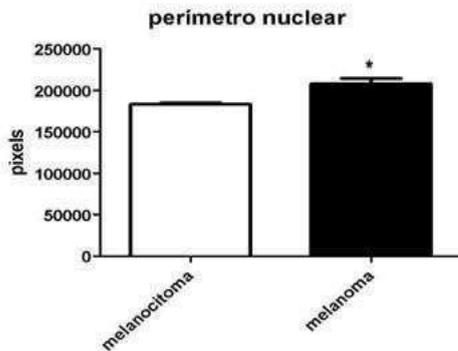


Figura 5. Gráfico apresentando o perímetro nuclear, expresso em pixels, em amostras de melanocitomas e melanomas caninos, com diferença estatisticamente significativa, $p < 0,0001$, teste T de Student não-pareado.

Em relação à avaliação epigenética, foi aferido o padrão de metilação do elemento LINE-1, com destaque para a diferença estatisticamente significativa entre os grupos relativa à razão 5-meC/5-hmeC (Figura 6).

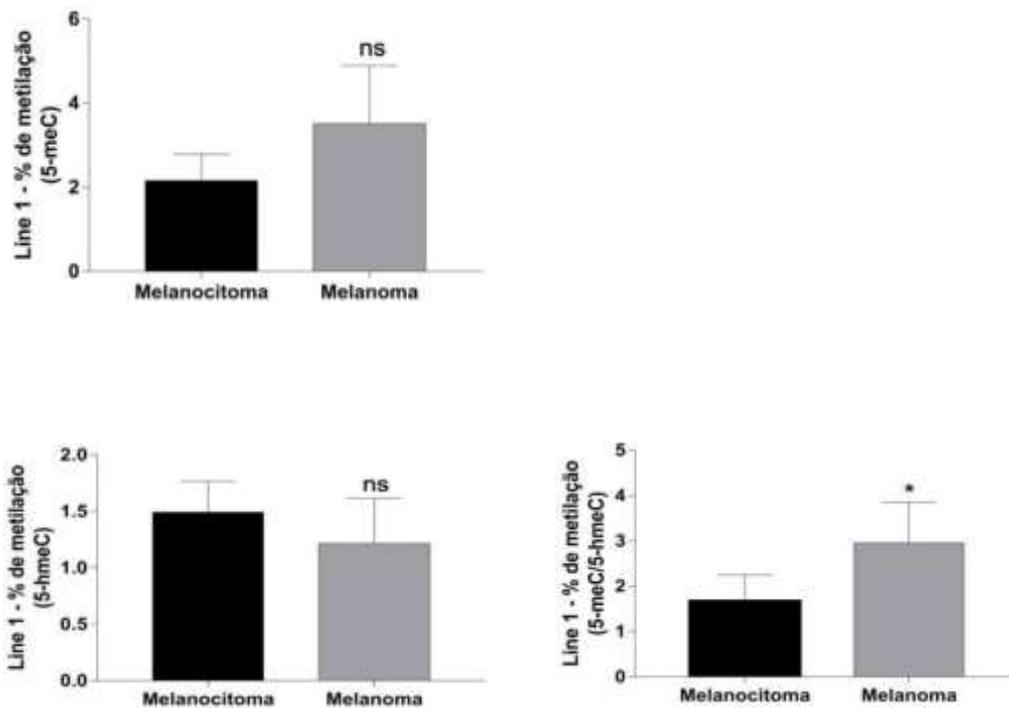


Figura 6. Representação gráfica da avaliação da metilação do elemento LINE-1 em melanomas cutâneos, considerando as marcas 5-meC (metilação) e 5-hmeC (desmetilação), onde não houve diferença significativa entre melanocitoma e o melanoma e a razão entre elas 5-meC/5-hmeC, na qual foi possível verificar que no melanoma está hipermetilado, com diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

As neoplasias melanocíticas representam um problema de saúde pública. Lesões dessa natureza estão distribuídas em humanos e em diversas espécies animais, como equinos, suínos e cães. Os últimos, usualmente abordados com um modelo biológico de ocorrência natural, ganhando destaque na busca pela compreensão da biologia desses processos (Simpson et al., 2014). Em literatura não há comprovação sobre predisposição sexual, entretanto diversos estudos relatam maior incidência em machos. Embora pequena nossa amostragem está em consonância com essa observação, tendo sido avaliadas 10 lesões em machos e 8 em fêmeas. Predominaram animais SRD (11/18), seguindo-se schnauzers e rottweilers, com 2 exemplares de cada. De acordo com Ramos-Vara et al. (2000), os schnauzers estão entre as raças mais acometidas. Em um estudo de Camargo et al. (2008) com melanomas cutâneos, os cães SRD tiveram maior frequência, seguidos da raça rottweiler.

Um aspecto particularmente instigante nessa condição é a relação entre comportamento biológico e localização lesional. Nesse sentido, formações melanocíticas orais e labiais são hegemonicamente malignas, enquanto as cutâneas em geral envolvem um prognóstico favorável (Bergin et al., 2011; Smedley et al., 2011). Assim, lesões em mucosa oral são naturalmente mais agressivas, implicando em menor sobrevida média (147 dias), quando comparadas às digitais e labiais (676 dias), e às de outras localidades cutâneas (725 dias) (Spangler & Kass, 2006). Esta é uma possível explicação para a menor disponibilidade de estudos acerca das lesões melanocíticas cutâneas caninas, se comparadas às orais. Em certa medida, este estudo visa fomentar uma maior compreensão acerca dessas condições ainda incompletamente investigadas. As lesões melanocíticas compõem uma fração relevante das neoplasias cutâneas caninas, correspondendo, os melanocitomas, entre 3-4% desse contingente, e os melanomas entre 0,8 e 2% (Conroy, 1983; Goldschmidt & Shofer, 1992). Considerando as amostras deste estudo, todas referentes à pele, pudemos observar que as lesões em região de cabeça foram benignas, enquanto as prepúciais, malignas. Este último achado está de acordo com a observação de Smith et al. (2002) na qual consideram que, além de lábios, outras junções mucocutâneas são sítios frequentes de expansões malignas, como prepúcio, vulva, ânus e focinho. Também nas formações em membros houve uma tendência à malignidade, sendo diagnosticado 1 melanocitoma e 4 melanomas. Ressalta-se que dentro desse grupo estão as lesões digitais, caracteristicamente relacionadas a pior prognóstico dentre todas as localidades cutâneas, com sobrevida dos pacientes em 2 anos de 56%, quando a média para as demais regiões cutâneas para o período é de 83,8% (Laprie et al., 2001).

A faixa etária dos animais acometidos está de acordo com o descrito em literatura, com lesões malignas acometendo animais mais velhos (Goldschmidt & Shofer, 1992; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Nishiya et al., 2016), com idade média de 10 anos para os cães com melanocitoma e 11 anos para os com melanomas.

O diagnóstico diferencial entre as lesões melanocíticas caninas representa um desafio, dada a relativa inespecificidade de parâmetros morfológicos clássicos, como as dimensões tumorais e as características citológicas de anaplasia. Existem achados controversos sobre a correlação entre dimensões tumorais e comportamento biológico, com dois estudos indicando correlação negativa entre aumento de volume tumoral e tempo de sobrevida em melanomas orais (Hahn et al., 1994; Proulx et al., 2003). Já Millanta et al., 2002, não encontraram relação entre tamanho e comportamento biológico em lesões melanocíticas cutâneas caninas. A capacidade de distinção entre benignidade e malignidade a partir de características histológicas também tem sido fonte de controvérsia, em particular pela subjetividade da avaliação morfológica e pela heterogeneidade das populações celulares (Smedley et al., 2011).

Consoante com a natureza da condição oncológica, enfocamos a abordagem de parâmetros nucleares para avaliar as diferenças entre expansões benignas e malignas, considerando parâmetros morfológicos clássicos, morfométricos e epigenéticos.

Os critérios de malignidade nucleares para distinção entre neoplasias melanocíticas benignas e malignas incluem: pleomorfismo nuclear, anisocariose, macrocariose, hiper cromasia, e figuras de mitoses atípicas (Daleck, 2016; Smedley et al., 2011; Spangler & Kass, 2006).

Nesse sentido, merece destaque a utilização da atividade proliferativa e da fração de crescimento tumoral na distinção entre condições benignas e malignas (Roels et al., 1999; Laprie et al., 2001). Roels et al., (1999) visando a redução da subjetividade na avaliação, compararam a fração de crescimento entre melanocitomas e melanomas caninos, com o emprego da imunomarcagem pelo Ki-67, observando diferença estatisticamente significativa entre eles. Posteriormente Laprie et al. (2001) obtiveram uma relação direta entre índice mitótico (obtido a partir da contagem de mitoses em

10 campos de grande aumento consecutivos (CGA) e a imunexpressão de Ki-67, sendo a contagem superior a 2 mitoses em 10CGA indicativa de menor sobrevida. A partir dessas informações o principal parâmetro utilizado na distinção entre lesões benignas e malignas de origem melanocítica passou a ser o índice mitótico.

As características morfológicas, naturalmente mais subjetivas, foram deslocadas para uma posição secundária. No entanto, recentemente, a partir do estudo de Donizy et al. (2017), evidenciando relação entre morfologia nucleolar (frequência, tamanho e número) e comportamento biológico em lesões melanocíticas humanas, esses parâmetros voltaram a ganhar destaque na investigação oncológica. Há evidências de que os mecanismos que controlam a proliferação celular também regulam a taxa de biogênese ribossômica, relação observada em células cancerígenas, sugerindo que as alterações em genes supressores tumorais ou em proto-oncogenes, regulam positivamente a biogênese do ribossomo, aumentando as dimensões nucleolares e a taxa de proliferação celular (Davidpfeuty, 2006; Sulic's et al.,2006). Neste estudo, em acordo com os achados de Donizy et al. (2017) a avaliação da frequência nucleolar, demonstrou diferença estatisticamente entre lesões benignas e malignas, com incremento nucleolar nas últimas. Em complemento, as atipias nucleares também foram avaliadas por meio do escore nuclear, Segundo Campagne et al, 2013; Millanta et al., 2002; Spangler & Kass, 2006, a atipia nuclear sinaliza para um prognóstico desfavorável. Em nosso estudo avaliamos o escore nuclear um indicador de atipia nuclear, sendo identificados escores inferiores em melanocitomas.

Outro parâmetro analisado neste estudo foi a morfometria nuclear, ainda pouco utilizada na medicina veterinária. De acordo com Andrea et al. (2008), informações importantes para o diagnóstico e prognóstico podem ser obtidas através da avaliação morfométrica. Em especial a objetividade dos achados confere maior relevância em termos biológicos (Baak et al.,1987; Bacus et al.,1997; Breslow et al.,1999; Vauthey et al., 2002). Segundo Webster et al. (2009) heterogeneidade no tamanho e forma nucleares podem ser associadas a malignidade e núcleos aumentados à metastização. De acordo com Carlson et al. (2009) as diferenças cariométricas entre lesões melanocíticas benignas e malignas refletem alterações genéticas e epigenéticas durante a progressão de nevos melanocíticos humanos em melanoma. Mijovic et al. (2013), demonstrou diferenças morfométricas significativas entre os núcleos de melanócitos neoplásicos em tecido humano. Nunes et al. (2019), analisaram a aplicabilidade da morfometria no estadiamento de lesões melanocíticas humanas. Leitinger et al. (1990) obtiveram resultados significativos na distinção entre nevos benignos e melanoma maligno comparando a área nuclear média nas porções superficial e profunda das lesões.

Em nosso estudo foi avaliado o perímetro nuclear, identificando-se diferença estatisticamente significativa entre melanocitomas e melanomas, mostrando-se como uma alternativa eficaz e de baixo custo método para discernir malignidade (Ravazi et al.,2020).

Neste estudo foi investigado a epigenética, na qual descreve eventos influenciados pelo ambiente, entre genótipo e sua expressão fenotípica, esses eventos ocorrem independente da sequência nucleotídica do DNA, tendo produto final mudanças herdáveis da função gênica e expressão fenotípica (Feinberg; Tycko, 2004).

A metilação do DNA ocorre normalmente nos mamíferos e esse fenômeno garante o silenciamento de genes mantendo o controle da expressão gênica, integridade cromossômica e eventos de recombinação. Alterações epigenéticas podem interferir na expressão de diversos fatores de transcrição ao DNA, modulando a expressão gênica, potencializando fenótipos patológicos (Jones, 2012; Kang et al., 2007; Wu & Sun, 2006).

Há indícios de que o envelhecimento está associado a alterações epigenéticas. O processo de envelhecimento fisiológico é acompanhado por alterações funcionais, incluindo perda de função imunológica e maior exposição a fatores ambientais (Richardson, 2003). Segundo Ahuja et al. (2000) mudanças relacionadas à idade na metilação do DNA envolvem eventos de hipermetilação e hipometilação. De acordo com Lister et al. (2009) há evidências de que o padrão de metilação do DNA muda com a idade e que a metilação anormal em algumas ilhas CpG é um ponto inicial na carcinogênese.

Esses distúrbios adicionais do envelhecimento refletem mudanças na expressão gênica devido à metilação alterada do DNA (Teschendorff et al.,2010). Maegawa et al. (2010) realizaram uma comparação entre camundongos com 3 meses de idade e camundongos com 35 meses de idade, demonstrando uma taxa alta de desregulação epigenética nos mais velhos, relacionando-a ao envelhecimento. A hipometilação de LINE-1 foi descrita como um biomarcador epigenético do envelhecimento humano. Mahmood et al. (2020), observaram relação entre idade e a metilação do LINE-1, sugerindo que a perda gradual da metilação de LINE-1 durante o envelhecimento, pode contribuir como um dos fatores de risco para vários cânceres.

A hipometilação global do DNA está associada a diversos tipos de cânceres em humanos como: carcinomas de ovário, próstata, fígado e leucemias, podendo ser estimada através da verificação do padrão de metilação de elementos de transposição, como o elemento LINE-1. O padrão de metilação de LINE-1 no sangue periférico tem sido associado ao risco de câncer e varia em diferentes tipos de câncer em humanos (Friso, 2013), com potencial uso na detecção precoce de câncer e prognóstico ainda inexplorados em cães (Brennan & Flanagan, 2012).

Em humanos mais de 70 genes foram descritos como hipermetilados em melanomas, relacionados ao silenciamento gênico, como, por exemplo, o CDKN2A (Straume et al. 2002). Araújo et al. (2015) investigaram o padrão de metilação de LINE-1 em leucócitos em pacientes portadores de melanoma cutâneo. Curiosamente esses pacientes apresentavam mutações em CDKN2A e os níveis de LINE-1 estavam elevados, sugerindo a hipermetilação em melanoma. Hyland et al. (2013) realizaram um estudo em leucócitos de pacientes com melanoma, na qual não foi possível detectar diferenças na metilação de LINE-1, em grupo controle e pacientes com melanoma. Ishizaki et al. (2020), em estudo com cães, compararam o padrão de metilação do elemento LINE-1 entre cães hígidos e portadores de melanoma em mucosa. Scattone et al. (2021) com o propósito de determinar a metilação global do DNA, avaliaram o sangue periférico de cães diagnosticados com melanoma oral, melânico e amelanico.

Ishizaki et al. (2020) , analisaram a metilação de DNA em todo o genoma de linhagens celulares e amostras clínicas de melanomas caninos, identificando grande número de genes hipermetilados.

Avaliamos neste estudo a possível correlação entre as alterações no perfil de metilação do DNA, através do status de metilação LINE-1 na diferenciação entre melanocitomas e melanomas cutâneos caninos. Isoladamente, 5-meC e 5-hmeC não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Porém considerando-se a razão 5-meC/5-hmeC em regiões promotoras do gene, houve maior metilação em melanomas, mostrando diferença estatisticamente significativa em relação às amostras de melanocitoma.

De acordo com Xu et al. (2020), a 5-metilcitosina (5-meC), é uma modificação comum, atuando na regulação da expressão gênica. Já a 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) é essencial na função de desmetilação do DNA na qual modula a expressão gênica ajustando o nível desmetilação do DNA. Experimentos realizados com ratos mostram que a redução na 5-meC em tecidos tumorais, induz a carcinogênese e promove ativação de oncogenes e mobilização de retrotransposons no genoma. Em alguns estudos relacionados ao melanoma maligno e outros cânceres em humanos é observada a diminuição na expressão de 5-hmeC (Nestor et al.,2012; Jin et al.,2011; Tahl et al.,2021; Tahiliani et al., 2009; Xiao et al.,2020).

Portanto, em diferentes tipos de câncer o padrão de metilação LINE-1 está associado ao risco de câncer, e parece variar tanto para hipometilação quanto a hipermetilação. Em nosso estudo devido a limitação técnica só fizemos a verificação da metilação em uma pequena região do LINE-1, indicando que nesta região encontrava-se mais metilado nos melanomas, sendo possível que em outras ilhas CpG o evento se repita, sugerindo ser uma característica da espécie canina (Araújo et al.,2015; Brennan & Flanagan, 2012). As causas e mecanismos envolvidos nessas diferenças no perfil de metilação do LINE-1 ainda não estão bem esclarecidos, ressaltando-se a necessidade de mais estudos sobre o tema.

CONCLUSÃO

A análise direcionada ao núcleo das células neoplásicas, com o emprego da morfologia convencional e da cariometria foi relevante na distinção entre as neoplasias melanocíticas cutâneas benignas e malignas em cães. O emprego da avaliação epigenética, utilizando como parâmetro o padrão da metilação do LINE-1 evidenciou diferenças entre as lesões benignas e malignas, contribuindo para completar o perfil distintivo entre as duas condições.

Agradecimentos:- Ao CAPES pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Declaração de conflito de interesse: Nenhum.

REFERÊNCIAS

Araújo, É.S.S., Kashiwabara, A.Y., Achatz, M.I.W., Moredó, L.F., De Sá, B. C. S., Duprat, J. P., Krepisch, A. C. V. 2015. LINE-1 hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis. *Melanoma Research*, 25(2): 173-177. <<https://doi.org/10.1097/cmr.000000000000141>>.

Ahuja, N., Issa J.P. 2000. Aging, methylation and cancer. *Histol Histopathol*. 15(3): 835-42. <<https://doi.org/10.14670/HH-15.835>>.

Andrea, C.E., Bleggi-Torres, L.F., Alves, M.T.S. 2008. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos softwares de edição de imagem. *J Bras Patol Med Lab*, 44(1), 51-57. <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000100010>>.

Bacus, J.W., Bacus, J.V., Stoner, G.D., Moon, R.C., Kelloff, G.J., Boone, C.W. 1997. Quantitation of preinvasive neoplastic progression in animal models of chemical carcinogenesis. *J Cell Biochem Suppl*. 28-29:21-38.

Baak, J.P. 1987. The principles and advances of quantitative pathology. *Anal Quant Cytol Histol*. 9(2): 89-95.

Bergman, P. J.; Kent, M. S.; Farese, J. P. 2013. Melanoma. p.321-331 In: Withrow, S. J.; Vail, D. M.; Page, R. L. *Withrow & MacEwen's - Small Animal Clinical Oncology*. Missouri: Elsevier.

Bergin, I.L., Smedley, R.C., Esplin, D.G., Spangler, W.L., Kiupel, M. 2011. Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol*. 48(1): 41-53. <<https://doi.org/10.1177/0300985810388947>>.

Bostock DE. 1979. Prognosis after surgical excision of canine melanomas. *Vet Pathol*. 16(1): 32-40. <<https://doi.org/10.1177/030098587901600103>>.

Brennan, K., Flanagan, J.M. 2012. Is there a link between genome-wide hypomethylation in blood and cancer risk? *Cancer Prev Res (Phila)*. 5(12): 1345-57. <<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0316>>.

Breslow NE, Partin AW, Lee BR, Guthrie KA, Beckwith JB, Green DM. 1999. Nuclear morphometry and prognosis in favorable histology Wilms' tumor: A prospective reevaluation. *J Clin Oncol*. (7):2123-6. <<https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.7.2123>>.

Camargo, L., Conceição, L.G.; Costa, P.R.S. 2008. Neoplasias melanocíticas cutâneas em cães: estudo retrospectivo de 68 casos (1996-2004). *Braz. J. Vet Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 138-152.

Campagne, C., Julé, S., Alleaume, C., Bernex, F., Ezagal, J., Château-Joubert, S., Estrada, M., Aubin-Houzelstein, G., Panthier, J.J., Egidy, G. 2013. Canine melanoma diagnosis: RACK1 as a potential biological marker. *Vet Pathol*. 50(6): 1083-90. <<https://doi.org/10.1177/0300985813490754>>.

Carlson, J.A., Ross, J.S., Slominski, A.J. 2009. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clin Dermatol*. 27(1): 75-102. <<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.007>>.

Conroy, J.D. Canine skin tumors. 1983. *Journal of American Animal Hospital Association*. 19: 91-114.

Daleck, C.R., De Nardi, A.B. 2016. Neoplasias do Sistema Reprodutivo Masculino. p.557-569. In: Daleck, Carlos Roberto; De Nardi, Andrigo Barboza de. *Oncologia em Cães e Gatos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Roca.

David-Pfeuty T. 2006. The flexible evolutionary anchorage-dependent Pardee's restriction point of mammalian cells: how its deregulation may lead to cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1765(1): 38-66. <[https://doi: 10.1016/j.bbcan.2005.08.00](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.08.00)>.

Deans, C., Maggert, K.A. 2015. What do you mean, "epigenetic"? *Genetics*. 199(4): 887-96. <[https://doi: 10.1534/genetics.114.173492](https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492)>.

De Araújo, É. S. S., Kashiwabara, A. Y., Achatz, M. I. W., Moredo, L. F., De Sá, B. C. S., Duprat, J. P., Krepischi, A. C. V. 2015. LINE-1 hypermethylation in peripheral blood of cutaneous melanoma patients is associated with metastasis. *Melanoma Research*, 25(2), 173-177. <[https://doi:10.1097/cmr.000000000000141](https://doi.org/10.1097/cmr.000000000000141)>.

Dias, F. G. G., Pereira, L.F., Cabrini, T.M., Rocha, J.R. 2013. Neoplasias orais nos animais de companhia: revisão de literatura. *Revista científico-eletrônica de medicina veterinária*, Garça, n. 20. http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ncCoalIH79a8X7H_2013-6-21-16-12-48.pdf.

Díaz-Cano S, González-Cámpora R, Ríos-Martín JJ, Lerma-Puertas E, Jordà-Heras M, Vázquez-Ramírez F, Bibbo M, Galera-Davidson H. 1993. Nuclear DNA patterns in adrenal cortex proliferative lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 423(5): 323-8. <[https://doi: 10.1007/BF01607143](https://doi.org/10.1007/BF01607143)>.

Donizy, P., Biecek, P., Halon, A., Maciejczyk, A., Matkowski, R. 2017. Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells - a new prognostic approach to an old concept. *Diagn Pathol*. 12(1): 88. <[https://doi: 10.1186/s13000-017-0675-7](https://doi.org/10.1186/s13000-017-0675-7)>.

Feinberg, A.P., Tycko, B. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 4(2): 143-53. <[https://doi:10.1038/nrc1279](https://doi.org/10.1038/nrc1279)>.

Furano, A.V. 2000. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 64:255-94. <[https://doi: 10.1016/s0079-6603\(00\)64007-2](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)64007-2)>.

Friso, S., Udali, S., Guarini, P., Pellegrini, C., Pattini, P., Moruzzi, S., Girelli, D., Pizzolo, F., Martinelli, N., Corrocher, R., Olivieri, O., Choi, S.W. 2013. Global DNA hypomethylation in peripheral blood mononuclear cells as a biomarker of cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 22(3): 348-55. <[https://doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0859](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0859)>.

Goldschmidt, M. H. 1998. Pigmented lesions of the skin. *Clinics in Dermatology*, v. 12, p.507-514.

Goldschmidt, M.H. & Hendrick, M.J. 2002. Tumors of skin and soft tissues. 788p. In: MEUTEN DJ. *Tumors in domestic animals*, 4th ed. Iowa State Press.

Goldschmidt, M.H. & Shofer, F. S. 1992. *Skin tumors of the dog & cat*. Dermatology. 1 ed. Oxford: Pergamon Press. 316 p.

Gross, T.L.,Ihrke, P.J. Walder, E.J. Affolter, V.K. 2005. Melanocytic tumors. 9312p. In: Skin diseases of the dog and cat 2th ed. Oxford, Blackwell Science.

Hahn, K.A.,Nicola, De D.B.,Richardson, E.A.,Hahn, E.A.1994.Canine oral malignant melanoma: prognostic utility of an alternative staging system. *Journal of Small Animal Practice*, v. 35, n. 5, p. 251-256, <[https://doi: 10.1111/j.1748-5827.1994.tb03273.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1994.tb03273.x)>.

Hanahan, D., Weinberg, RA. 2011. The hallmarks of cancer. *The new generation, Cell*, v.100: 57-70.

Hyland, P.L., Burke, L.S, Pfeiffer, R.M., Mirabello, L., Tucker, M.A., Goldstein, A.M., Yang, X.R. 2013. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Melanoma Res.* 23(1): 55-60. <[https://doi: 10.1097/CMR.0b013e32835adc51](https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e32835adc51)>.

Ishizaki, T., Yamazaki, J., Meagawa, S., Yokoyama, N., Aoshima, K., Takiguchi, M., Kimura, T. 2020. Long interspersed nucleotide element-1 hypomethylation in canine malignant mucosal melanoma. *Vet Comp Oncol.* (4):854-860. <[https://doi: 10.1111/vco.12591](https://doi.org/10.1111/vco.12591)>

Ishizaki, T., Yamazaki, J.,Aoshima, K.,Kimura, T. 2020.Genome-wide DNA methylation analysis identifies promoter hypermethylation in canine malignant melanoma. *Res Vet Sci.* 132:521-526. <[https://doi: 10.1016/j.rvsc.2020.08.006](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.006)>.

Jarvis, L.R. & Whitehead R. 1975. Morphometric analysis of gastric dysplasia. *Journal of Pathology*, v. 147: p. 133-138 < <https://doi.org/10.1002/path.1711470209>>.

Jin, S.G., Wu, X., Li, A.X., Pfeifer, G.P. 2011.Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res.* (12):5015-24. <[https://doi: 10.1093/nar/gkr120](https://doi.org/10.1093/nar/gkr120)>.

Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.*13(7): 484-92. <[https://doi: 10.1038/nrg3230](https://doi.org/10.1038/nrg3230)>.

Kang MI, Kim HS, Jung YC, Kim YH, Hong SJ, Kim MK, Baek KH, Kim CC, Rhyu MG. 2007. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J Cell Biochem.* 102(1): 224-39. <[https://doi: 10.1002/jcb.21291](https://doi.org/10.1002/jcb.21291)>.

Laprie, C., Abadie, J., Amardeilh, M.F., Net, J.L., Lagadic, M., Delverdier, M. 2001. MIB-1 immunoreactivity correlates with biologic behaviour in canine cutaneous melanoma. *Vet Dermatol.* (3):139-47. <[https://doi: 10.1046/j.1365-3164.2001.00236.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2001.00236.x)>.

Leitinger, G., Cerroni, L.,Soyer, H.P., Smolle, J.,Kerl, H.1990.Morphometric diagnosis of melanocytic skin tumors. *Am J Dermatopathol.* (5):441-5. <[https://doi: 10.1097/00000372-199010000-00002](https://doi.org/10.1097/00000372-199010000-00002)>.

Lindholm, C & Hofer, P.A. 1986. Caryometry of benign compound acquired naevi, Spitz epitheloid naevi and malignant melanomas.*Acta Pathol Microbiol Immunol Scand A* 94(6): 371-4. <[https://doi: 10.1111/j.1699-0463.1986.tb03007.x](https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1986.tb03007.x)>.

Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R, Lee, L., Ye Z, Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 462(7271):315-22. <[https://doi: 10.1038/nature08514](https://doi.org/10.1038/nature08514)>.

Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H.S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L.A., Issa, J.P. 2010. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* (3):332-40. <[https://doi: 10.1101/gr.096826.109](https://doi.org/10.1101/gr.096826.109)>.

Mahmood,W.,Erichsen,L.,Ott,P.;Schulz,W.A.;Fischer,J.C.;Bravo,A.M.J.;Bendhack,M.L.;Hassan,M.;Santourlidis,S.2020. Alterações distintivas da metilação do DNA associadas ao envelhecimento dos retrotransposons LINE-1 em DNA puro livre de células de sangue humano. *Sci Rep* 10, 22127 <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-79126-z>>.

Melo, A. R. D. S. 2015. Influência Da Exposição Solar No Perfil De Metilação De Dna Dos Genes Mmp9 E Mir137. João Pessoa. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

Millanta, F., Fratini, F., Corazza, M., Castagnaro, M., Zappulli, V., Poli A. 2002. Proliferation activity in oral and cutaneous canine melanocytic tumours: correlation with histological parameters, location, and clinical behaviour. *Res Vet Sci.* (1):45-51.<[https://doi: 10.1016/s0034- 5288\(02\)00041-3](https://doi: 10.1016/s0034- 5288(02)00041-3)>.

Mijovic, Z., Kostov, M., Mihailovic, D., Zivkovic, N., Stojanovic, M., Zdravkovic, M. 2013. Correlation of nuclear morphometry of primary melanoma of the skin with clinicopathological parameters and expression of tumor suppressor proteins (p53 and p16(INK4a) and bcl-2 oncoprotein. *J BUON.* (2):471-6.

Modiano, J.F., Ritt, M.G., Wojcieszyn, J. 1999. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med.* (3):163-74. <[https://doi: 10.1892/0891-6640\(1999\)013<0163:tmbocm>2.3.co;2](https://doi: 10.1892/0891-6640(1999)013<0163:tmbocm>2.3.co;2)>.

Molognoni, F., Cruz, A.T., Meliso, F.M., Morais, A.S., Souza, C.F., Xander, P., Bischof, J.M., Costa, F.F., Soares, M.B., Liang, G., Jones, P.A., Jasiulionis, M.G. 2011. Epigenetic reprogramming as a key contributor to melanocyte malignant transformation. *Epigenetics.* (4): 450-64. <<https://doi: 10.4161/epi.6.4.14917>>.

Nestor, C.E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., Katz, E., Dixon, J.M., Harrison, D.J., Meehan, R.R. 2012. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res.* (3):467-77. <<https://doi: 10.1101/gr.126417.111>>.

Nishiya, A.T., Massoco, C.O., Felizzola, C.R., Perlmann, E., Batschinski, K., Tedardi, M.V., Garcia, J.S., Mendonça, P.P., Teixeira, T.F., Zaidan, Dagli M.L. 2016. Comparative Aspects of Canine Melanoma. *Vet Sci.* 3(1): 7. <<https://doi: 10.3390/vetsci3010007>>.

Nunes, T.W.N., Filippi-Chiela, E.C., Callegari-Jacques, S.M., da Silva, V.D., Sansonowicz, T., Lenz, G., Roehe, A.V. 2019. Nuclear morphometric analysis in tissue as an objective tool with potential use to improve melanoma staging. *Melanoma Res.* (5):474-482.<<https://doi:10.1097/CMR.0000000000000594>>.

Poropatch, K., Yang, J.C., Goyal, R. Medição do tamanho nuclear para distinguir carcinomas uroteliais de urotélio reativo em cortes de tecido. *Diagnostic Pathol* 11, 57 (2016). <<https://doi.org/10.1186/s13000-016-0501-7>>.

Pulley, L.T., Stannard, A.A. 1990. Tumors of the skin and soft tissues. pp. 23-72 In: Tumors in domestic animals, ed. Moulton JE, 3rd ed., University of California Press, Berkeley and Los Angeles.

Proulx, D.R., Ruslander, D.M., Dodge, R.K., Hauck, M.L., Williams, L.E., Horn, B.A., Price, G.S., Thrall, D.E. 2003. Retrospective analysis of 140 dogs with oral melanoma treated with external beam radiation. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, v. 44, n. 3, p. 352-359. <<https://doi: 10.1111/j.1740-8261.2003.tb00468.x>>.

Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E., Miller, M.A., Johnson, G.C., Pace, L.W., Fard, A., Kottler, S.J. 2000.

Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol.* (6):597-608. <[https://doi: 10.1354/vp.37-6-597](https://doi.org/10.1354/vp.37-6-597)>.

Razavi, M.A., Wong, J., Akkera, M., Shalaby, M., Shalaby, H., Sholl, A., Haddad, A., Behl, P., Kandil E., Lee, G.S. 2020. Nuclear morphometry in indeterminate thyroid nodules. *Gland Surg.* (2):238-244. <[https://doi: 10.21037/gs.2020.02.02](https://doi.org/10.21037/gs.2020.02.02)>.

Richardson, B. 2003. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev.* (3):245-61. <[https://doi: 10.1016/s1568-1637\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s1568-1637(03)00010-2)>.

Rodrigues, A. H. F.,Albuquerque, C.P.C.,Cavalcante, C.D.,Peixoto,A.S. 2019. Mecanismos epigeneticos no cancer de mama: O papel dos biomarcadores e da medicina personalizada. *Revista Interscientia*,v.7,n.2,p174-186.

Roels, S., Tilmant, K., Ducatelle, R. 1999.PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *J Comp Pathol.* (1):13-24.<[https://doi: 10.1053/jcpa.1998.0291](https://doi.org/10.1053/jcpa.1998.0291)>.

Rosenthal, R. C. Segredos em Oncologia Veterinária. 2004.1. ed. Rio Grande do Sul: Artmed.296p.

Scattoni, N.V., Epiphanyo, T.M.F., Caddrobi, K.G., Ferrão, J.S.P., Hernandez-Blazquez, F.J., Loureiro, A.P.M., Massoco, C.O., Dagli, M.L.Z. 2021. Quantification of Global DNA Methylation in Canine Melanotic and Amelanotic Oral Mucosal Melanomas and Peripheral Blood Leukocytes From the Same Patients With OMM: First Study. *Front Vet Sci*, v. 8, p.68. <[https://10.3389/fvets.2021.680181](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.680181)>

Simpson, R. M. Bastian, B.C. Michael, H.T. Webster, J.D. Prasad, M.L. Conway, C.M. Prieto, V.M. Gary, J.M. Goldschmidt, M.H. Esplin, D.G. Smedley, R.C. Piris, A. Meuten, D.J.Kiupel, M. Lee, C.C. Ward,J.M.,Dwyer,J.E.,Davis,B.J.,Anver,M.R.,Molino,A.A.,Hoover,S.B.,Canales,J.R.&Hewitt,S.2014."Melanoma esporádico de ocorrência natural em cães como modelo pré-clínico para melanoma humano." *Pesquisa de células de pigmento e melanoma* 27.1: 37-47.

Smedley, R.C., Spangler, W.L., Esplin, D.G, Kitchell, B.E, Bergman, P.J., Ho, H.Y., Bergin, I.L., Kiupel, M. 2011. Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Vet Pathol.* (1):54-72. <[https://doi: 10.1177/0300985810390717](https://doi.org/10.1177/0300985810390717)>.

Smith, S. H., Goldschmidt, M. H., Mcmanus, P. M. A. 2002: Comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol*, v.39, p.651-678.

Spangler, W.L., Kass, P.H. 2006. The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol.* (2):136-49. < [https://doi: 10.1354/vp.43-2-136](https://doi.org/10.1354/vp.43-2-136) >.

Straume, O., Smeds, J., Kumar, R., Hemminki, K., Akslen, L.A. 2002. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol.* (1):229-37.<[https://doi: 10.1016/S0002-9440\(10\)64174-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64174-0)>.

Strefezzi, R.de. F., Xavier, J.G., Catão-Dias, J.L. 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* (3):268-75. <[https://doi: 10.1354/vp.40-3-268](https://doi.org/10.1354/vp.40-3-268)>.

Sulic´ S., Panic, L., Dikic, I., Volarevic, S.2005 Deregulation of cell growth and malignant transformation. *Croat Med J.* 46:622–638.

Tahl, A., Riggi, N., Nardou, K., Nicolas, M., Kaya, G., Moulin, A. 2021. 5-Hydroxymethylcytosine Loss in Conjunctival Melanoma. *Dermatopathology (Basel).* (2):176-184. <[https://doi: 10.3390/dermatopathology8020023](https://doi.org/10.3390/dermatopathology8020023)>.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. (5929):930-5. [https://doi: 10.1126/science.1170116](https://doi.org/10.1126/science.1170116).

Teschendorff, A.E., Menon, U., Gentry-Maharaj A., Ramus, S.J., Weisenberger, D.J., Shen, H., Campan, M., Noushmehr, H., Bell, C.G., Maxwell, A.P., Savage, D.A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S.A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P.W., Jacobs, I.J., Widschwendter M. 2010. Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res*. 440-6. <[https://doi: 10.1101/gr.103606.10](https://doi.org/10.1101/gr.103606.10)>.

Tollefsbol, T.O. 2017. An Overview of Epigenetics. 1-3p. In: *Handbook of Epigenetics. The New Molecular and Medical Genetics*. 2th ed. Al,USA.Elsevier.

Vauthey, J.N., Lauwers, G.Y., Esnaola, N.F., Do, K.A., Belghiti, J., Mirza, N., Curley, S.A., Ellis, L.M., Regimbeau, J.M., Rashid, A., Cleary, K.R., Nagorney, D.M. 2002. Simplified staging for hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*. (6):1527-36. <[https://doi: 10.1200/JCO.2002.20.6.1527](https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.6.1527)>.

Venza, I., Visalli, M., Tripodo, B., De Grazia, G., Loddo, S., Teti, D., Venza, M. 2010. FOXE1 is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. (5):1093-7. <[https://doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09560.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09560.x)>.

Webster, M., Witkin, K.L., Cohen-Fix, O. 2009. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci*. (Pt 10):1477-86. <[https://doi: 10.1242/jcs.037333](https://doi.org/10.1242/jcs.037333)>.

Wu, H. & Sun, E, Y. 2006. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatric research*, v.59, p. 21- 25. <<https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000203565.76028.2a>>.

Xavier, J. G. Fotomicrografia de Corte Histológico: arquivo pessoal. Pós-graduação em Patologia ambiental e experimental - Universidade Paulista, São Paulo, 2021.

Xiao, Q., Nobre, A., Piñeiro, P., Berciano-Guerrero, M.Á, Alba, E., Cobo, M., Lauschke, V.M., Barragán, I. 2020. Genetic and Epigenetic Biomarkers of Immune Checkpoint Blockade Response. *J Clin Med*. (1):286. <[https://doi: 10.3390/jcm9010286](https://doi.org/10.3390/jcm9010286)>.

Xu, T., Gao, H. 2020. Hidroximetilação e tumores: a 5-hidroximetilação pode ser usada como marcador para diagnóstico e tratamento de tumores?. *Hum Genomics* 14,15 <<https://doi.org/10.1186/s40246-020-00265-5>>.

Yasumaru, C.C. 2019. Avaliação do crosstalk entre os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) e o fatorregulador de interferon 8 (IRF-8) no microambiente tumoral: estudo em melanoma oral canino. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 102p. Disponível em <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-02072019-114551/publico/Cassia_Correa_Yasumaru_original.pdf> Acesso em 15/04/2022.

Legenda das Figuras

Fig 1-2. Fotomicrografias de corte histológico de melanocitoma e melanoma cutâneo canino. (1) Corte histológico de melanocitoma cutâneo canino exibindo homogeneidade celular, com o predomínio de células pequenas, amíúde pigmentadas, com frequente obscurecimento nuclear. Cromatina frouxa, nucléolos indistintos. HE, obj. 40X. (2) Corte histológico de melanoma cutâneo evidenciando a presença de população neoplásica organizada em agregados, com anisocariose, nucléolos e evidentes e frequentemente múltiplos. HE, obj. 40X. São Paulo/SP, 2021.

Quadros

Quadro 1. Lesões Melanocíticas cutâneas avaliadas, considerando raça, gênero, idade, localização, escore nuclear (EN) e frequência de nucléolos (Nolo), São Paulo/SP, 2021.